

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of :
Minoru FUJIMORI et al. :
Serial No. NEW : Attn: Application Branch
Filed March 26, 2001 : Attorney Docket No. 2001_0206A

J1046 U.S. PTO
09/816391
03/26/01

#3
KD
12-12-01

ANAEROBIC BACTERIUM AS A DRUG FOR
CANCER GENE THERAPY

CLAIM OF PRIORITY UNDER 35 USC 119

Assistant Commissioner for Patents,
Washington, DC 20231

Sir:

Applicants in the above-entitled application hereby claim the date of priority under the International Convention of Japanese Patent Application No. 2000-287688, filed September 21, 2000, as acknowledged in the Declaration of this application.

A certified copy of said Japanese Patent Application is submitted herewith.

Respectfully submitted,

Minoru FUJIMORI et al.

By Warren M. Cheek, Jr.
Warren M. Cheek, Jr.
Registration No. 33,367
Attorney for Applicants

WMC/dlk
Washington, D.C. 20006-1021
Telephone (202) 721-8200
Facsimile (202) 721-8250
March 26, 2001

2001-0206A
Fujimori

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

J1046 U.S. PRO
09/816391
03/26/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 9月21日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-287688

出 願 人

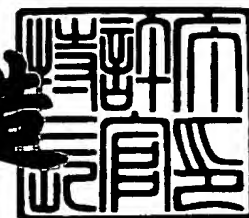
Applicant (s):

協和醗酵工業株式会社

2001年 2月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3004171

【書類名】 特許願

【整理番号】 DK04J225

【提出日】 平成12年 9月21日

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09
A61K 35/74
C12N 1/21

【発明者】

【住所又は居所】 長野県松本市旭3-1-1 信州大学医学部内

【氏名】 藤森 実

【発明者】

【住所又は居所】 長野県松本市旭3-1-1 信州大学医学部内

【氏名】 谷口 俊一郎

【発明者】

【住所又は居所】 長野県松本市旭3-1-1 信州大学医学部内

【氏名】 天野 純

【発明者】

【住所又は居所】 長野県松本市旭3-1-1 信州大学医学部内

【氏名】 矢澤 和虎

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市山科区御陵4丁野町1 京都薬科大学生命
薬学研究所内

【氏名】 加納 康正

【発明者】

【住所又は居所】 長野県松本市旭3-1-1 信州大学医学部内

【氏名】 中村 俊幸

【発明者】

【住所又は居所】 長野県松本市旭 3-1-1 信州大学医学部内

【氏名】 佐々木 貴之

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077012

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩谷 龍

【電話番号】 06-4796-1300

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 066372

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 嫌気性菌を用いた遺伝子治療用医薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 嫌気的環境下にある腫瘍組織特異的に DNA を輸送するシステムにおいて、該 DNA にコードされる蛋白質の活性が親株より高いビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属に属する微生物を遺伝子輸送担体として用い、該腫瘍組織内で該 DNA を発現させることを特徴とする、遺伝子輸送方法。

【請求項 2】 嫌気的環境下にある腫瘍組織特異的に DNA を輸送するシステムにおいて、該 DNA を有する組換え体 DNA で形質転換されたビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属に属する微生物を遺伝子輸送担体として用い、該腫瘍組織内で該 DNA を発現させることを特徴とする、遺伝子輸送方法。

【請求項 3】 DNA が、以下の DNA から選ばれる DNA であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

(a) 抗腫瘍活性を有する蛋白質をコードする DNA

(b) 抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質をコードする DNA

【請求項 4】 抗腫瘍活性を有する蛋白質が、インターロイキン-2 であることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 抗腫瘍物質前駆体が、5-フルオロシトシン、5-アジリジノ-2, 4-ジニトロベンズアミド、ガンシクロビル、グルクロン酸抱合抗腫瘍物質またはリジン抱合抗腫瘍物質から選ばれる物質であることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】 抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質が、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、単純ヘルペス 1 型 チミジンキナーゼ、 β -グルクロニダーゼから選ばれる蛋白質であることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】 組換え体 DNA が、発現ベクターであることを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】 発現ベクターが、ビフィドバクテリウム属に属する微生物内

で機能するプロモーターおよびターミネーターを有することを特徴とする、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】 プロモーターおよびターミネーターが、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) 由来のヒストン様 DNA 結合蛋白質 (HU 蛋白質) をコードする遺伝子の発現に係るプロモーターおよびターミネーターであることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】 プロモーターおよびターミネーターとして、配列番号 1 に記載の塩基配列のそれぞれ塩基番号 1 ~ 192 および 472 ~ 600 で表される DNA を使用することを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】 微生物が、ビフィドバクテリウム・ロンガムであることを特徴とする、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】 微生物が、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A / pBLES100-S-eCD (FERM BP-7274) であることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 または 5 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】 請求項 1 ~ 4 または 7 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の微生物を用いることを特徴とする、腫瘍組織内特異的に抗腫瘍活性を有する蛋白質を発現させる方法。

【請求項 14】 請求項 1 ~ 3 または 5 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の微生物を用いることを特徴とする、腫瘍組織内特異的に抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に転換する活性を有する蛋白質を発現させる方法。

【請求項 15】 請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載されている微生物を含有してなる医薬。

【請求項 16】 医薬が、請求項 1 ~ 3 または 5 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の微生物と抗腫瘍剤前駆体とを組み合わせることを特徴とする、請求項 15 に記載の医薬。

【請求項 17】 医薬が、請求項 1 ~ 3 または 5 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の微生物と抗腫瘍物質前駆体とを含有することを特徴とする、請求項 15 に記載の医薬。

【請求項 18】 微生物が、ビフィドバクテリウム・ロンガムであることを

特徴とする、請求項 1 5 ～ 1 7 に記載の医薬。

【請求項 1 9】 微生物が、ビフィドバクテリウム・ロンガム 1 0 5 - A / p B L E S 1 0 0 - S - e C D (F E R M B P - 7 2 7 4) であることを特徴とする、請求項 1 5 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の医薬。

【請求項 2 0】 請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法に用いられるビフィドバクテリウム属に属する微生物。

【請求項 2 1】 請求項 1 ～ 3 または 5 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法に用いられるビフィドバクテリウム・ロンガム 1 0 5 - A / p B L E S 1 0 0 - S - e C D (F E R M B P - 7 2 7 4) 。

【請求項 2 2】 配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA。

【請求項 2 3】 請求項 1 ～ 1 4 に記載の方法を用いることを特徴とする、固形腫瘍の治療方法。

【請求項 2 4】 請求項 1 ～ 3 または 5 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の微生物と抗腫瘍物質前駆体とを組み合わせる癌患者に投与することを特徴とする、固形腫瘍の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明が属する技術分野】

本発明は、固形腫瘍の遺伝子治療に有用なビフィドバクテリウム属に属する嫌気性菌、それを含む医薬、およびそれを用いた遺伝子輸送方法ならびに固形腫瘍の治療方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

低酸素部位は、動物の固形腫瘍に特徴的であり (Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1984;10:695-712)、人間のさまざまな固形腫瘍においても高頻度で起こる (New York:Fischer-Verlag, stuttgart;1994:219-232)。ガン患者において行われた組織酸素電極 (溶存酸素を測定することができる膜検査装置) 測定では、通常の組織の酸素分圧の中央値は 2 4 ～ 6 6 m m H g であるのに対し、腫瘍では中央値が 1 0 ～ 3 0 m m H g であり、またかなりの比率で酸素分圧が 2 . 5 m m H

gを下回った。

そこで、低酸素腫瘍細胞における遺伝子の発現を目的とした固形腫瘍の遺伝子治療が、近年研究されている (Nat Med.1997;3:515-520)。その結果、クロストリジウム (*Clostridium*) 属菌またはビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属菌などのある種の嫌気性菌は、静脈へ注入すると、固形腫瘍の低酸素部位で選択的に増殖することが知られている (Cancer Res.1980;40:2061-2068,1955;15:473-478)。

【 0 0 0 3 】

また、クロストリジア (*Clostridia*) やサルモネラ (*Salmonella*) などの微生物について遺伝子輸送担体としての有効性が検討されている (Gene Ther.1997;4:791-796,1996;3:173-178, FEMS Microbiol Rev.1995;17:357-364, Cancer Biother Radio.1996;11:145-153, Nat Biotechnol.1999;17:37-41)。

しかし、これらの微生物は人間の体内において病原性を有することから、必ずしも、固形腫瘍の遺伝子治療において安全な遺伝子輸送担体とはいえない。実際、クロストリジウム ブチリカム (*Clostridium butyricum*) の孢子の注入やサルモネラ チフィ (*Salmonella typhi*.) の経口投与のあと、副作用として発熱するという有害反応が報告されている (Eur J Cancer.1967;3:37-41, J Clin Invest.1992;90:412-420, Infect Immun.1992;60:536-541)。

【 0 0 0 4 】

一方、ビフィドバクテリウム属菌およびラクトバシラス (*Lactobacillus*) 属菌は、人間や他の動物の小腸の下流または大腸で見られるグラム陽性菌であり、常在菌で、かつ病原性のない微生物である。

特に、ビフィドバクテリウム属菌は、多くのアジアおよび欧米諸国で、乳製品の発酵の調合に広く使われおり、該微生物に病原性のないことは今では一般的に受け入れられている。加えて該微生物は、病原性を有するどころか宿主の健康を促進する特性を持つことも知られている。かかる有益な特性として、例えば、免疫応答の増強 (J Dairy Sci.1991;74:1187-1195)、発ガンの抑制 (Cancer Res.1993;53:3914-3918)、ウィルス感染から宿主を防御すること (Lancet.1994;344:1046-1049) などが挙げられる。

【 0 0 0 5 】

このように食物科学、医薬および産業界において、該ビフィドバクテリウム属菌が非常に注目を集めているにもかかわらず、遺伝子治療においてはあまり用いられていなかった。

遺伝子治療に対するこれらの微生物の潜在力を利用することができるようになるためには、細胞の生合成、遺伝子の発現、タンパク質の分泌または遺伝学のような基本的な生物学的現象についての詳細な知識を必要とするが、遺伝子導入のための効率的で再現性のある体系および十分な選択マーカーがないために、ビフィドバクテリウム属菌の遺伝的な特性についてほとんど知られていなかったからである。

【 0 0 0 6 】

しかし、近年、使いやすく、再現可能なビフィドバクテリウム属菌の遺伝的形質転換システムが開発された (Microbiology 1996;142:109-114, Biosci Biotechnol Biocem.1997;61:1211-1212)。

しかしながら、導入した遺伝子がコードするタンパク質を高濃度に発現するためのプロモーターをはじめとする調節配列の開発は十分ではなかった。

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、固形腫瘍の遺伝子治療に有効で、かつ人畜により安全な遺伝子輸送担体としてのビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属に属する嫌気性菌、および上記嫌気性菌を含有することを特徴とする医薬を提供することにある。

本発明の他の目的は、上記嫌気性菌を遺伝子輸送担体として用いて、嫌気的環境下にある腫瘍組織特異的に、固形腫瘍の遺伝子治療に有効なDNAを輸送する遺伝子輸送方法、該方法を用い該DNAにコードされている蛋白質を発現させることによる固形腫瘍の治療方法を提供することにある。

【 0 0 0 8 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、(a) ヒトおよび動物の固形腫瘍は低酸素状態にあること、(

b) ビフィドバクテリウム属菌は嫌気性菌であり、通常組織では増殖が困難であるが、嫌気性環境下にある腫瘍組織内では増殖すること、(c) ビフィドバクテリウム属菌は、従来遺伝子輸送担体として用いられていたクロストリジアやサルモネラなどの微生物よりも病原性が少ないこと等の公知事実に基づき、ビフィドバクテリウム属菌を遺伝子輸送担体として用いることを知見した。

さらに、本発明者らは、ビフィドバクテリウム属に属する微生物の遺伝的形質転換システムについて検討を重ねたところ、ビフィドバクテリウム属に属する微生物、特にビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) で元来高発現しているヒストン様DNA結合タンパク質 (Biochimie 1990; 72; 207-212) [以下、HUタンパク質と略す。] をコードする遺伝子の発現に関わるプロモーターおよびターミネーターをベクターに組み込むことにより、導入した遺伝子を効率よく発現させることができることを見出した。

本発明者らは、上記目的を達成すべくさらに鋭意検討を重ね、本発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は、

(1) 嫌気的環境下にある腫瘍組織特異的にDNAを輸送するシステムにおいて、該DNAにコードされる蛋白質の活性が親株より高いビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する微生物を遺伝子輸送担体として用い、該腫瘍組織内で該DNAを発現させることを特徴とする、遺伝子輸送方法、

(2) 嫌気的環境下にある腫瘍組織特異的にDNAを輸送するシステムにおいて、該DNAを有する組換え体DNAで形質転換されたビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する微生物を遺伝子輸送担体として用い、該腫瘍組織内で該DNAを発現させることを特徴とする、遺伝子輸送方法、

(3) DNAが、以下のDNAから選ばれるDNAであることを特徴とする、前記(1)または(2)に記載の方法、

(a) 抗腫瘍活性を有する蛋白質をコードするDNA

(b) 抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質をコードするDNA

(4) 抗腫瘍活性を有する蛋白質が、インターロイキン-2であることを特徴とする、前記(3)に記載の方法、

(5) 抗腫瘍物質前駆体が、5-フルオロシトシン、5-アジリジノー2, 4-ジニトロベンズアミド、ガンシクロビル、グルクロン酸抱合抗腫瘍物質またはリジン抱合抗腫瘍物質から選ばれる物質であることを特徴とする、前記(3)に記載の方法、

(6) 抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質が、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、単純ヘルペス1型 チミジンキナーゼ、 β -グルクロニダーゼから選ばれる蛋白質であることを特徴とする、前記(3)に記載の方法、

(7) 組換え体DNAが、発現ベクターであることを特徴とする、前記(2)に記載の方法、

(8) 発現ベクターが、ビフィドバクテリウム属に属する微生物内で機能するプロモーターおよびターミネーターを有することを特徴とする、前記(7)記載の方法、

(9) プロモーターおよびターミネーターが、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) 由来のヒストン様DNA結合蛋白質(HU蛋白質)をコードする遺伝子の発現に係るプロモーターおよびターミネーターであることを特徴とする、前記(8)に記載の方法、

(10) プロモーターおよびターミネーターとして、配列番号1に記載の塩基配列のそれぞれ塩基番号1~192および472~600で表されるDNAを使用することを特徴とする前記(8)に記載の方法、

(11) 微生物が、ビフィドバクテリウム・ロンガムであることを特徴とする、前記(1)~(10)のいずれか1に記載の方法、

(12) 微生物が、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A/pBLES 100-S-eCD (FERM BP-7274)であることを特徴とする、前記(1)~(3)または(5)~(11)のいずれか1に記載の方法、

(13) 前記(1)~(4)または(7)~(11)のいずれか1に記載の微生物を用いることを特徴とする、腫瘍組織内特異的に抗腫瘍活性を有する蛋白質を

発現させる方法、

(14) 前記(1)～(3)または(5)～(11)のいずれか1に記載の微生物を用いることを特徴とする、腫瘍組織内特異的に抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に転換する活性を有する蛋白質を発現させる方法、

(15) 前記(1)～(12)のいずれか1に記載されている微生物を含有してなる医薬、

(16) 医薬が、前記(1)～(3)または(5)～(12)のいずれか1に記載の微生物と抗腫瘍物質前駆体とを組み合わせることを特徴とする、前記(15)に記載の医薬、

(17) 医薬が、前記(1)～(3)または(5)～(12)のいずれか1に記載の微生物と抗腫瘍物質前駆体とを含有することを特徴とする、前記(15)に記載の医薬、

(18) 微生物が、ビフィドバクテリウム・ロンガムであることを特徴とする、前記(15)～(17)に記載の医薬、

(19) 微生物が、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A/pBLES100-S-eCD(FERM BP-7274)であることを特徴とする、前記(15)～(18)のいずれか1に記載の医薬、

(20) 前記(1)～(12)のいずれか1に記載の方法に用いられるビフィドバクテリウム属に属する微生物、

(21) 前記(1)～(3)または(5)～(11)のいずれか1に記載の方法に用いられるビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A/pBLES100-S-eCD(FERM BP-7274)、

(22) 配列番号1に記載の塩基配列を有するDNA、

(23) 前記(1)～(14)に記載の方法を用いることを特徴とする、固形腫瘍の治療方法、

(24) 前記(1)～(3)または(5)～(12)のいずれか1に記載の微生物と抗腫瘍物質前駆体とを組み合わせることを特徴とする、固形腫瘍の治療方法、

(25) 抗腫瘍活性を有する蛋白質を実質的に嫌気的環境下にあるガン細胞にお

いてのみ発現し得る遺伝子を有するビヒドバクテリウム属に属する嫌気性菌、および、

(26) 人畜に低毒性である抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質を実質的に嫌気的環境下にあるガン細胞においてのみ発現し得る遺伝子を有するビヒドバクテリウム属に属する嫌気性菌、に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明は、抗腫瘍活性を有する物質をコードする遺伝子を有し、該抗腫瘍活性を有する物質の活性が親株より高いビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属に属する微生物 (以下、ビフィドバクテリウム属菌と略す。) を提供する。

該抗腫瘍活性を有する物質の活性が親株より高いとは、例えば、親株より該物質の発現量が多い場合、親株において発現する該物質である酵素に比べ K_m 値が向上する場合、または親株において発現する該物質よりも分解され難くなったために結果的に高活性を示す場合等が挙げられる。

該抗腫瘍活性を有する物質の活性が親株より高いか否かは、自体公知のスクリーニング法を用いて容易に調べることができる。例えば、ビフィドバクテリウム属菌を適当な培地で培養し、産出された該抗腫瘍活性を有する物質の活性 (発現量や酵素活性等) を公知の方法で測定するという方法が挙げられる。

【0011】

該抗腫瘍活性を有する物質は、抗腫瘍活性を有するものであればその機構は問わず公知のものを用いてよい。ここで、抗腫瘍活性としては、腫瘍細胞もしくは組織の発生、成熟、増殖もしくは拡散を予防もしくは抑制する作用、または腫瘍細胞もしくは組織を退縮化させることができる等の活性が挙げられる。なお、前記腫瘍には、例えば、癌腫または肉腫などが含まれる。ただし、本発明における抗腫瘍活性を有する物質は、通常はその構造が DNA の塩基配列にコードされ得るポリペプチドまたはタンパク質である。

【0012】

本発明における抗腫瘍活性を有する物質として、具体的には、例えば、サイト

カインが挙げられる。抗腫瘍活性を有するサイトカインとしては、具体的にはインターフェロン(IFN)- α 、 β 、 γ 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン(IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、腫瘍壊死因子(TNF)- α 、リンホトキシン(LT)- β 、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)、白血病抑制因子(LIF)、T細胞活性化共刺激因子B7(CD80)およびB7-2(CD86)、キッド・リガンド、オンコスタチンM等が挙げられる。中でも、IL-2が好ましい。

これらを2種以上組み合わせてもよい。例えば、IL-6とTNF- α 、IFN- α 、IFN- β またはIFN- γ との組み合わせ、TNF- α とIFN- γ との組み合わせ、anti-FasとIFN- γ との組み合わせが好ましい。

【0013】

本発明は、人畜に低毒性である抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に転換しえる酵素(以下、転換酵素と略す)をコードする遺伝子を有し、実質的に嫌気的環境下にある腫瘍組織内においてのみ該酵素を発現し得るビフィドバクテリウム(*Bifidobacterium*)属に属する微生物を提供する。

該抗腫瘍物質は、抗腫瘍活性を有する公知物質を用いてよい。抗腫瘍活性とは上述の記載と同様である。ただし、抗腫瘍物質前駆体為人畜に低毒性である必要がある。抗腫瘍物質前駆体は不活性体であってもよい。不活性化体とは、転換酵素によって活性体に変換され抗腫瘍活性を発現する物質を意味する。

また、転換酵素は、抗腫瘍物質前駆体と抗腫瘍物質との組み合わせにより、適宜選択することができる。該転換酵素は、1種の酵素または複数種の酵素群であってもよいが、好ましくは1種の酵素がよい。

【0014】

本発明で用いられる抗腫瘍物質前駆体、抗腫瘍物質および転換酵素の組み合わせは、公知のものであれば本発明においていずれも用いることができる。

例えば、具体的には、抗腫瘍物質前駆体が5-フルオロシトシン(5-FC)

、抗腫瘍物質が5-フルオロウラシル(5-FU)、転換酵素としてシトシンデアミナーゼを用いる組み合わせが挙げられる。

また、抗腫瘍物質前駆体が5-アジリジノ-2,4-ジニトロベンズアミド(5-aziridino-2,4-dinitrobenzamide) [CB1954]、抗腫瘍物質が2本鎖DNAに橋状結合をおこすことが知られているアルキル化剤、転換酵素としてニトリダクターゼを用いる組み合わせが挙げられる。

また、抗腫瘍物質前駆体がガンシクロビル(ganciclovir)、抗腫瘍物質がその代謝物、転換酵素が単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ(herpes simplex virus type1 thymidine kinase) [HSV1-TK]を用いる組み合わせが挙げられる。

またさらに、抗腫瘍物質をグルクロン酸抱合、グリシン抱合またはリジン抱合などで修飾して人体に低毒な前駆体(不活性化体を含む)とし、転換酵素として該前駆体を脱修飾する酵素を用いることもできる。該前駆体を脱修飾する酵素としては自体公知のものを用いてもよいが、例えば、グルクロン酸抱合された抗腫瘍物質前駆体と、転換酵素が β -グルクロニダーゼの組み合わせが挙げられる。

【0015】

本発明で用いられるビフィドバクテリウム属菌は、嫌気性であれば該属に属する公知の菌株のいずれを用いてもよい。

具体的にはビフィドバクテリウム・アドレッセンティス(*Bifidobacterium adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム(*B. longum*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(*B. bifidum*)、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム(*B. pseudolongum*)、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム(*B. thermophilum*)、ビフィドバクテリウム・ブリーベ(*B. breve*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス(*B. infantis*)などが挙げられる。

中でも、年齢に関係なくヒトの腸内に常在していることが知られているビフィドバクテリウム・アドレッセンティス(*B. adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム(*B. longum*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(*B. bifidum*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス(*B. infantis*)を用いることが好ましく、ビフィドバクテリウム・ロンガム(*B. longum*)〔以下、*B. l*

ongum菌と略すこともある] を用いることがより好ましい。また、これらの耐性株、変異株等を用いてもよい。

これらの菌は、いずれも市販されているか、または寄託機関から容易に入手できる菌体である。例えば、寄託番号は、ビフィドバクテリウム・ロンガム (B. longum) が ATCC-15707、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (B. bifidum) が ATCC-11863、ビフィドバクテリウム・インファンティス (B. infantis) が ATCC-15697 である。

【0016】

上記ビフィドバクテリウム属菌のうち、上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素を産出できる株があり、かかる株は本発明における遺伝子輸送担体として好適に用いることができる。具体的には、例えば、5-FCを5-FUに転換できるシトシンデアミナーゼを産出する B. longum 菌が挙げられる。

上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素を産出できる株か否かは、公知のスクリーニング方法を用いて、抗腫瘍活性を有する物質もしくは転換酵素が検出されるか、または抗腫瘍物質前駆体を添加した培地で菌を培養した場合抗腫瘍物質が検出されるか等により容易に判断できる。

【0017】

上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素を産出できない株は、以下のようにして上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素をコードするDNAを導入することにより、本発明における遺伝子輸送担体として好適に用いることができる。

なお、以下の遺伝子工学または生物工学の基本操作については、市販の実験書、例えば、遺伝子マニュアル 講談社、高木康敬編 遺伝子操作実験法 講談社、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) (1982)、モレキュラー・クローニング第2版 (Molecular Cloning, 2nd ed.) コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) (1989)、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.) , 194 (1991)、実験医学別冊・酵母による遺伝子実験法 羊土社(1994)等に記載された方法に従って行う

ことができる。

【 0 0 1 8 】

まず第一に、上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素をコードする DNA を得る必要がある。

上記の DNA は、公知の塩基配列情報から容易に得ることができる。

例えば、公知の塩基配列情報から、公知方法を用いて化学合成によって得ることができる。化学合成法としては、例えばフォスフォアミダイト法を利用した DNA 合成機 model 392 (パーキン・エルマー株式会社製) 等の DNA 合成機で化学合成する方法が挙げられる。

また、該塩基配列の 5' 端および 3' 端の塩基配列に基づいたプライマーを調製し、各種生物の組織または細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーから選択した cDNA を鋳型として、PCR 法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] を用いて DNA の増幅を行うことにより、上記の DNA を取得することもできる。

またさらに、公知塩基配列情報に基づき、その全長または一部を化学合成した DNA またはポリヌクレオチドをプローブとして、各種生物の組織または細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリー対してコロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第 2 版) を行うことにより、上記の DNA を取得することもできる。

【 0 0 1 9 】

また、上記の DNA は公知のアミノ配列情報からも容易に得ることができる。

公知のアミノ配列情報から上記の DNA を得る方法としては、自体公知の方法を用いてよい。具体的には、例えば、公知のアミノ配列をコードする DNA の部分塩基配列を有する合成 DNA プライマーを用いて、PCR 法によって前記 cDNA ライブラリー等から目的とする DNA を増幅する方法、または適当なベクターに組み込んだ DNA と、上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素の一部あるいは全領域をコードする DNA 断片もしくは合成 DNA を標識したもの (プローブ) とのハイブリダイゼーションによって選別する方法などが挙げられる。

【 0 0 2 0 】

抗腫瘍活性または転換酵素活性は知られているが、該抗腫瘍活性を有する物質または該転換酵素のアミノ酸配列および該抗腫瘍活性を有する物質または該転換酵素をコードするDNAの塩基配列ともに公知でない場合、該抗腫瘍活性を有する物質または該酵素をコードするDNAを取得する方法としては、該抗腫瘍活性または該酵素活性が確認されている生物から発現cDNAライブラリーを公知の方法等に従って作製し、該抗腫瘍活性または該酵素活性を指標にして該ライブラリーを構成する個々の細胞をスクリーニングし、該抗腫瘍活性を有する物質または該転換酵素をコードするDNAを保有する細胞を得る方法が挙げられる。

また、該抗腫瘍活性を有する物質または該転換酵素を自体公知の方法の組み合わせにより精製し、該抗腫瘍活性を有する物質または該転換酵素のN末端のアミノ酸配列を公知の方法に従って解析し、該アミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を有する合成DNAをプローブとして用いて、上記したようにcDNAライブラリー等に対してハイブリダイゼーションを行うことによっても抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素を取得することができる。

【 0 0 2 1 】

より具体的には、シトシンデアミナーゼをコードするDNAは、大腸菌由来のシトシンデアミナーゼをコードするDNAを含有するプラスミドpA d e x 1 C S C D（理化学研究所 ジーンバンク R D B No. 1 5 9 1）、または同じく大腸菌由来のシトシンデアミナーゼをコードするDNAを含有するプラスミドpMK 1 1 6から単離されるものを用いるのか好ましい(D. A. Mead et al., Protein Engineering 1:67-74 (1986))。

ニトロリダクターゼは、E. coli Bから単離されたものを用いるのか好ましい。そのアミノ酸配列は、Biochem Pharmacol;44:2289-2295に記載されており、そのアミノ酸配列に基づき上記方法によりニトロリダクターゼをコードするDNAを容易に得ることができる。

【 0 0 2 2 】

本発明においては、上記公知塩基配列情報またはアミノ酸配列情報に基づいて得られる抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素をコードするDNAのほかにも

、該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを用いることができる。すなわち、一般に1つのアミノ酸に対して複数種の遺伝暗号が存在するため、公知塩基配列または公知アミノ酸配列に基づく塩基配列とは異なる塩基配列を有するDNAであっても、抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素を発現できれば、本発明において用いることができる。

【0023】

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとは、上記DNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味する。

具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、約0.7～1.0M程度の塩化ナトリウム存在下、約65℃程度でハイブリダイゼーションを行った後、約0.1～2倍程度濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、約65℃程度条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。

上記ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、上記公知塩基配列情報またはアミノ酸配列情報に基づいて得られる抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素をコードするDNAの塩基配列と少なくとも約60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは約80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0024】

本発明においては、上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有し、抗腫瘍活性または抗腫瘍物質の前駆体を抗腫瘍物質に転換できる作用を有する

タンパク質またはポリペプチドを用いることもできる。

かかるタンパク質またはポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487(1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素をコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより行うことができる。

欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、1個から数十個、特に1個から数個のアミノ酸であることが好ましい。

【0025】

第二に、上記のようにして得られた上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素をコードするDNA等を有する組換え体DNAを作製する。本発明において、組換え体DNAは発現ベクターが好ましい。

発現ベクターは、例えば、目的とするDNA断片を切り出し、該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

発現ベクターに挿入するDNA断片として、例えば、上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素をコードするDNAを目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNA断片はその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素をコードするDNAに付加することもできる。

【0026】

上記発現ベクターは、本発明に係る抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素の発現をさせるため、または発現に有利となるように、通常は以下に述べるクロ-

ニングベクターに調節配列を付加したものである。各々の調節配列はクローニングベクターに対して内在性であっても外来性であってもよい。

このような調節配列としては、これらに限られないが、プロモーター、リーダー、プロペプチド配列、エンハンサー、シグナル配列、選択マーカーおよびターミネーターを挙げることができる。なかでも調節配列としては、少なくともプロモーターおよびターミネーターを含むのが好ましい。

調節配列には、抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素をコードするDNAとの連結、および上記調節配列の間の連結が容易になるように、リンカー（制限酵素切断部位）をもたせることもできる。

【 0 0 2 7 】

本発明においてプロモーターおよびターミネーターとしては、ビフィドバクテリウム属菌、特に B. longum 菌で元来高発現しているHU遺伝子（配列番号1）の発現に関わるプロモーターおよびターミネーターを用いるのが特に好ましい。具体的には、プロモーターとして配列番号1に記載の塩基配列のそれぞれ塩基番号1～192で表されるDNAを、ターミネーターとして配列番号1に記載の塩基配列のそれぞれ塩基番号472～600で表されるDNAを用いるのが好ましい。

HU遺伝子の発現に関わるプロモーターおよびターミネーターを有する発現ベクターは、B. longum 菌のDNAから制限酵素でHU遺伝子を切り出し、これを下記するクローニングベクターの中に組み入れ、さらにHU遺伝子の発現に関わるプロモーターの下流に、上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素をコードするDNA等を組み込むことにより作製するのが特に好ましい。該HU遺伝子の発現に関わるプロモーターおよびターミネーターを用いることにより、上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素を効率よく発現させることができる。

HU遺伝子の単離方法は、B. longum 菌の染色体DNAを制限酵素Hind IIIで消化するという方法が挙げられる。

【 0 0 2 8 】

より具体的には、以下のような態様が挙げられる。B. longum 菌の染

色体DNAを制限酵素Hind IIIで消化し、フェノール処理・エタノール沈殿により精製する。また、pBR322（宝酒造社製）もHind IIIで消化し、脱リン酸処理後、同様に精製する。各々DNAを連結し、組換え体DNAを得る。

次に該組換えDNAを用いてE. coli mH3 [Gene, 45, 37 (1986)] を常法に従い形質転換し、アンピシリン耐性で、かつテトラサイクリン感受性を示す形質転換体を取得する。取得した形質転換体から常法に従いプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドDNAを常法に従いE. coli YK2741株 [Gene, 89, 133 (1990)] に導入して、該菌株の形質転換を行う。YK2741株はHU遺伝子およびIHF（インテグレーション ホスト ファクター）遺伝子が欠損しているため、低温感受性を呈する株であることを利用して、アンピシリン含有寒天培地に塗布して27℃にて培養することにより形質転換体を選択できる。

次に、上記で得られたYK2741株の形質転換体をさらに培養し、常法により該株が保持するプラスミドを抽出し、該プラスミドDNAを常法に従いE. coli YK1340 [J. Mol. Biol., 204, 581 (1988)] に導入して、該菌株の形質転換を行う。得られた形質転換体に対し、Muファージの感染試験を常法に従い行う。YK1340株はHU遺伝子の欠損株であり、Muファージはその増殖にHU蛋白質を必要とするため、Muファージが感染・増殖し、溶菌する形質転換体がB. longum菌由来のHU遺伝子を保有する株の有力な候補となりえる。したがって、アンピシリン耐性を示し、かつMuファージが感染・増殖し、溶菌する株が保有するプラスミド選択することにより、B. longum菌由来のHU遺伝子の発現に関わるプロモーターおよびターミネーターを保有するプラスミドpBLHU15を得ることができる。

【0029】

また、シグナル配列を組み込むことにより、たとえば、宿主細胞内に生産された上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。すなわち、シグナル配列により、本発明の上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素の手前にシグナルペプチドを付加した形で発現することとなり、その結果、上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

シグナルペプチドを付加する方法としては、例えば、ポールソンらの方法 [J.

Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、または特開平 5 - 3 3 6 9 6 3、WO 9 4 / 2 3 0 2 1 等に記載の方法などが挙げられる。

【 0 0 3 0 】

選択マーカーは、形質転換されたビフィドバクテリウム属菌のみを選択するために用いられる。例えば、アンピシリン耐性、テトラサイクリン耐性、ネオマイシンもしくはカナマイシン耐性などの薬剤耐性マーカー；栄養要求性；H A T 培地による選択など培地による選択等が挙げられる。

下記するクローニングベクターが、選択マーカーを有する場合は、さらに選択マーカーを組み込む必要はない。

【 0 0 3 1 】

本発明で用いることができるクローニングベクターは、(a) 上記抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素をコードする DNA と、試験管内で容易に組換え体を作ることができ、(b) ビフィドバクテリウム属菌内で増殖する能力をもち、(c) ビフィドバクテリウム属菌に導入することができ、(d) クローニングベクターが導入され形質転換されたビフィドバクテリウム属菌を特異的に検出することができれば、本発明において用いることができる。

【 0 0 3 2 】

クローニングベクターとしては、具体的には、プラスミド p B L E S 1 0 0 が挙げられ、該プラスミドは本発明において好適に使用される。

該プラスミド模式図は、図 1 で示される。図 1 からわかるように、大腸菌 (*Escherichia coli*) ベクター p B R 3 2 2 [図 1 中、1 本線で表されている部分] と *B. longum* 菌由来の p T B 6 プラスミド (3. 6 k b) [図 1 中、太線で表されている部分] との複合プラスミドに、エンテロコカス ファエカリス (*Enterococcus Faecalis*) 由来の 1. 1 k b の H i n d III · E c o R I 断片 (図 1 中、中抜き太線で表されている部分) が組み込まれている。該断片は、スペクチノマイシン耐性を示す領域、言い換えればスペクチノマイシン アデニルトランスフェラーゼ (spectinomycin adenyltransferase) をコードする領域を含んでいる。

【0033】

また、例えば、B. longum 菌 SBT595 株（工業技術院生命工学工業技術研究所受託番号 FERM P-14162）に由来し、図2で表される制限酵素認識部位を有する約2.9 kbの大きさのプラスミド pBL595 が挙げられる。

また、該プラスミド pBL595 と、大腸菌由来の pBR329 の Ava I・Hind III 断片と、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) 由来 pAMβ1 の Hind III・Ava I 断片からなるプラスミド pBLEM100（図3）が挙げられる。なお、該プラスミド pBLEM100 を保有する大腸菌が工業技術院生命工学工業技術研究所受託番号 FERM P-14102 として寄託されている。

【0034】

また、ストレプトコッカス属に属する微生物由来のプラスミドと大腸菌由来のプラスミドとを結合させた複合プラスミドと、B. longum 菌由来のプラスミド pBL67 または pBL78 とを結合してなるプラスミドベクターを用いてもよい（特開平5-130876）。

なお、プラスミド pBL67 は、B. longum 菌 MO9101 株（FERM P-12167）または B. longum 菌 MO9102 株（FERM P-12168）に由来し、図4で表される制限酵素認識部位を有する約3.7 kbの大きさのプラスミドである。また、プラスミド pBL78 は、B. longum 菌 MO9103 株（FERM P-12169）に由来し、図5で表される制限酵素認識部位を有する約8.5 kbの大きさのプラスミドである。

【0035】

また、大腸菌由来のプラスミド pBR322 と、B. longum 菌由来のプラスミド pTB4、pTB6 または pTB10 とを結合させたプラスミドも挙げられる。また、該プラスミドに、スタフィロコッカス オウレウス (*Staphylococcus aureus*) 由来の pC194 の全部またはクロラムフェニコール耐性遺伝子領域を結合させたプラスミドも挙げられる。さらに、上記2つのプラスミドのそれぞれに、B. longum 菌のトリプトファン合成系遺伝子を結合させた

プラスミドを用いてもよい（特開昭63-123384）。

なお、これらのプラスミドを保有する大腸菌が工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている（微工研菌寄第9040、9041、9042、9043、9044、9045、9046、9047、9048）。

なお、プラスミドpTB4またはpTB10は、B. longum菌BK25株（微工研菌寄第9049）に由来するプラスミドである。また、プラスミドpTB6は、B. longum菌BK51株（微工研菌寄第9050）に由来するプラスミドである。

【0036】

本発明に係る発現ベクターの好ましい態様としては、上述のベクターpBLE S100に、上述のHU遺伝子の発現に関わるプロモーターおよびターミネーターと、5-FCを5-FUに転換できるシトシンデアミナーゼ（以下、CDと略す）をコードする遺伝子（以下、CD遺伝子と略す）とを組み込んだ発現ベクターが挙げられる。

より具体的な態様としては、図6の模式図に示す発現ベクターが挙げられる。該発現ベクターの具体的な作成方法の一態様を以下に示す。TOP0 vector（フナコシ社製）に大腸菌由来のCD遺伝子を挿入した組換えDNAを用いて、E. coli JM109を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを抽出する。目的とするプラスミドpTOP0-eCDを制限酵素NspVおよびHpaIで消化し、約1.3kbのCDをコードするDNA断片を精製する。

同様に、前記のようにして得られたB. longum菌由来のHU遺伝子の発現に関わるプロモーターおよびターミネーターを保有するプラスミドpBLHU15もNspVおよびHpaIで消化し、6.7kbのDNA断片を精製する。

上記で得られた1.3kbおよび6.7kbのDNA断片を常法を用いて連結し組換え体DNAを取得し、該組換え体DNAを用いてE. coli JM109を常法に従い形質転換する。

次に、上記形質転換体から常法によりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドDNAをHindIIIで消化して、例えばアガロースゲル電気泳動などの常法により、HU遺伝子の発現に関わるプロモーターならびにターミネーターと、C

D 遺伝子とを含有する 3. 6 k b の DNA 断片を分離・精製する。また前述の Escherichia-Bifidobacterium のシャトルベクターである p BLES100 も H i n d III で消化し、脱リン酸化処理する。

上記 3. 6 k b の DNA 断片と p BLES100 の H i n d III 消化物を、常法により連結して組換え体 DNA を作製し該組換え体 DNA を用いて E. coli JM109 を常法に従い形質転換する。形質転換体はスペクチノマイシン耐性により選択できる。このようにして作製された HU 遺伝子のプロモーターの下流に CD をコードする遺伝子を有する Escherichia-Bifidobacterium のシャトルベクター p BLES100-S-e CD を得ることができる。

【 0 0 3 7 】

第三に、組換え体 DNA、好ましくは発現ベクターを、宿主であるビフィドバクテリウム属菌に導入する。該導入方法としては、自体公知の方法であればいずれも用いることができる。具体的には、例えば、例えば、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)]、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭 63-2483942)、または Gene, 17, 107 (1982) や Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979) に記載の方法等を挙げることができる。

本発明においては、エレクトロポレーション法を用いるのが好ましい。該エレクトロポレーションは、約 10.0 kV/cm、約 200 Ω 、約 25 μ F という条件のもと、約 4.1 ~ 4.5 ms 程度かけて行うのが好ましい。

【 0 0 3 8 】

導入する組換え体 DNA、好ましくは発現ベクターと宿主であるビフィドバクテリウム属菌との組み合わせは特に問わないが、プラスミド p BLES100 は B. longum 菌 105-A 株または 108-A 株 (Biosci. Biotech. Biochem. 1997, 61 (7), 1211-1212) に導入するのが好ましい。

図 6 に示した上述の HU 遺伝子の発現に関わるプロモーターならびにターミネーターと、CD 遺伝子とを組み込んだプラスミド p BLES100-S-e CD を導入し

形質転換させた B. longum 菌 105-A 株である B. longum 105-A/pBLES100-S-eCD が工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている (FERM BP-7274)。

【0039】

上記発現ベクターの導入したビフィドバクテリウム属菌は、公知の培地を用いて培養され、形質転換された菌のみが選択される。培地としては、その株に適切な公知の培地を適宜選ぶことができる。また、形質転換しているビフィドバクテリウム属菌を選択するために、通常は、かかる培地に選択マーカーに応じて各種薬剤又はアミノ酸等を添加しておく。

培地としては、例えば、B. longum 菌 BK25 株または BK51 株は、下記の組成を有する Briggs 培地で培養するのが好ましい。

Briggs 培地

トマトジュース抽出物 (*1)	400 ml
2% グルコース	20 g
可溶性デンプン	0.5 g
酵母エキス	6 g
ペプトン	15 g
グルタミン酸モノナトリウム塩	2 g
Tween 80	1 g
酢酸ナトリウム 3 水和水	10 g
リン酸 2 水素カリウム	4 g
塩化ナトリウム	5 g
蒸留水	600 ml
pH	6.8

(*1) 市販のトマトジュースに等量の蒸留水を加え、60℃で1時間保温後、100℃で5分間保持した後、残渣を濾別したもの。

【0040】

B. longum 菌 SBT0595 株は、下記に示す組成を有する TGAM 培地を用いて培養するのが好ましい。

TGAM培地の組成

トマトジュース抽出液	400 ml
ペプトン	10 g
酵母エキス	5 g
肝臓エキス末	1.2 g
グルコース	3 g
可溶性澱粉	5 g
塩化ナトリウム	3 g
Tween 80	1 g
L-システイン-HCl・H ₂ O	0.3 g
ダイズペプトン	3 g
プロテオースペプトン	10 g
消化血清末	13.5 g
肉エキス	2.2 g

【0041】

例えば、B. longum 菌 105-A 株または 108-A 株は、上記の組成を有する Briggs 培地のグルコースを 2% ラクトースに換え、さらに 0.2 g/L L-システイン、3.4 g/L アスコルビン酸ナトリウムを加えた培地で培養するのが好ましい。

B. longum 菌 MO9101 株、MO9102 株、MO9103 株は、1 GAM ブイヨン液体培地（日水製薬社製）を用いて培養するのが好ましい。

【0042】

上記ビフィドバクテリウム属に属する微生物の培養は、以下のようにして行うことができる。上記液体培地で培養する場合は、該液体培地に十分量のビフィドバクテリウム属に属する微生物を植菌後、約 30～40℃ 程度、好ましくは約 37℃ 程度において、約 12 時間程度以上、好ましくは対数増殖期中期になるまで静置にて、嫌気条件下で培養する。嫌気条件下とは、ビフィドバクテリウム属に属する微生物が増殖可能な程度の嫌気度を保てる密閉容器中であり、例えば嫌気チャンバーまたは嫌気ボックス等において可能な条件が挙げられる。

【 0 0 4 3 】

上記形質転換されたビフィドバクテリウム属菌は、嫌気的環境下にある腫瘍組織内でのみで増殖し、腫瘍組織内で抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素を発現することができる。したがって、かかる形質転換されたビフィドバクテリウム属菌は、嫌気的環境を有する腫瘍、好ましくは固形腫瘍の治療に有効な医薬として使用される。

本発明の医薬の投与経路は特に限定されず、経口投与または非経口投与などが挙げられるが、非経口投与が特に好ましい。非経口投与としては、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内などの投与経路を挙げることができる。

経口投与に適する製剤の例としては、例えば、錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、シロップ剤、溶液剤、カプセル剤または懸濁剤などを挙げることができ、非経口投与に適する製剤の例としては、例えば、注射剤、点滴剤、吸入剤、噴霧剤、坐剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤などを挙げることができる。

本発明においては、注射剤、中でも静脈内注射剤として用いることが好ましい。

【 0 0 4 4 】

上記形質転換されたビフィドバクテリウム属菌に、自体公知の後処理を行ってもよい。

例えば遠心分離などにより粗精製を行ってもよい。また、所望により粗精製を行った後、生理食塩水、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）または乳酸配合リンゲル液など当該分野で従来から使用されている溶媒に溶解または懸濁させてもよい。

また、所望により凍結乾燥または噴霧乾燥を行い、粉状物または粒状物にしてもよい。

【 0 0 4 5 】

本発明の医薬としては、上記形質転換されたビフィドバクテリウム属菌の溶液もしくは懸濁液、または粒状もしくは粉状の乾燥物をそのまま投与してもよい。しかし、一般的には、有効成分である上記の物質と1または2以上の製剤用添加物とを含む医薬組成物の形態で投与することが望ましい。

このような医薬組成物は、それ自体製剤学の分野で周知または慣用の方法に従って製造することが可能である。

【 0 0 4 6 】

経口投与に適する液体製剤の製造には、例えば、水、ショ糖、ソルビット、果糖などの糖類；ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類；ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類；p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤などの製剤用添加物を用いることができる。

また、カプセル剤、錠剤、散剤、または顆粒剤などの固形製剤の製造には、例えば、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニットなどの賦形剤；澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤；ポリビニールアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤；脂肪酸エステルなどの界面活性剤；グリセリンなどの可塑剤を用いることができる。

【 0 0 4 7 】

非経口投与に適する製剤のうち注射剤や点滴剤などの血管内投与用製剤は、好ましくはヒト血液と等張の水性媒体を用いて調製することができる。

例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、または塩溶液とブドウ糖溶液の混合物から選ばれる水性媒体を用い、常法に従って適当な助剤とともに溶液、懸濁液または分散液として調製することができる。

腸内投与のための坐剤は、例えばカカオ脂、水素化脂肪または水素化カルボン酸などの担体を用いて調製することができる。

噴霧剤は、ヒトの口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ有効成分である本発明に係るビフィドバクテリウム属菌を微細な粒子として分散させて吸収を促進することのできる担体を用いて調製することができる。このような担体として、例えば、乳糖またはグリセリンなどを用いることができる。本発明に係るビフィドバクテリウム属菌および用いる担体の性質により、エアロゾルやドライパウダーなどの形態の製剤として調製することができる。

非経口用の製剤の製造には、例えば、希釈剤、香料、防腐剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、可塑剤などから選択される1または2以上の製剤用添加物を用いることができる。

なお、本発明の医薬の形態およびその製造方法は、上記に具体的に説明したもの
のに限定されることはない。

【 0 0 4 8 】

本発明の医薬の投与量および投与頻度は特に限定されず、ビフィドバクテリウム
属菌が有する遺伝子の種類、治療すべき病態の種類、投与経路、患者の年齢お
よび体重、症状、および疾患の重篤度などの種々の条件に応じて適宜選択するこ
とが可能である。例えば、静脈内注射で全身投与する場合は、成人一日あたり約
 $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 個/body 程度を投与することが好ましく、腫瘍内局
所投与の場合は、腫瘍1個につき約 5×10^8 個程度投与することが好ましい。
しかし、投与量はこの特定の例に限定されることはない。

【 0 0 4 9 】

本発明にかかる医薬は、嫌気的環境を有する腫瘍、好ましくは各種固形癌に適
用できる。固形癌としては、例えば大腸癌、脳腫瘍、頭頸部癌、乳癌、肺癌、食
道癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、胆管癌、脾癌、脾島細胞癌、絨毛癌、結腸癌、腎細
胞癌、副腎皮質癌、膀胱癌、精巣癌、前立腺癌、睾丸腫瘍、卵巣癌、子宮癌、絨
毛癌、甲状腺癌、悪性カルチノイド腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、骨肉腫、軟部組
織肉腫、神経芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、網膜芽細胞腫、メラノーマ、扁平上皮
癌などが挙げられる。

【 0 0 5 0 】

本発明の医薬は、他の医薬等と併用してもよい。

特に、転換酵素をコードする遺伝子を導入したビフィドバクテリウム属菌を投
与する場合、抗腫瘍物質前駆体の投与は必須である。ただし、かかる抗癌物質前
駆体は、転換酵素をコードする遺伝子を導入したビフィドバクテリウム属菌と、
一製剤を成していてもよいし、また、別々の製剤であって同時にまたは間隔を空
けて投与してもよい。

また、20%ラクツロース (Lactulose) を併用することが好ましい。
ラクツロースはビフィドバクテリウム属菌の栄養源であり、かつ、ヒト、マウ
スおよびブタは代謝することができないため、ラクツロースを投与することによ
り腫瘍組織内特異的にビフィドバクテリウム属菌の菌数が増加するからである。

投与量は、成人一日あたり約 2 4 ~ 4 8 g / b o d y 程度が好ましく、投与頻度は特に問わない。

【 0 0 5 1 】

また、本発明の医薬は他の抗腫瘍剤等と組み合わせて用いることができる。一般的には、作用機序の異なる数種類の抗腫瘍剤と組み合わせて用いることが好ましい。

他の抗腫瘍剤等としては、例えば、アルキル化剤、各種代謝拮抗剤、抗腫瘍性抗生物質、その他抗腫瘍剤、抗腫瘍性植物成分、B R M（生物学的応答性制御物質）、血管新生阻害剤、細胞接着阻害剤、マトリックス・メタロプロテアーゼ阻害剤、ホルモン、ビタミン、抗菌性抗生物質または化学療法剤などが挙げられる。

より具体的には、アルキル化剤として、例えば、ナイトロジェンマスタード、ナイトロジェンマスタードN-オキシド、クロラムブチルなどのアルキル化剤；例えば、カルボコン、チオテパなどアジリジン系アルキル化剤；例えば、ディブロマンニトール、ディブロモダルシトールなどのエポキシド系アルキル化剤；例えば、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ニムスチンハイドロクロライド、ストレプトゾシン、クロロゾトシン、ラニムスチンなどニトロソウレア系アルキル化剤；ブスルファン；トシル酸インプロスルファン；ダカルバジンなどが挙げられる。

各種代謝拮抗剤としては、例えば、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、チオイノシンなどのプリン代謝拮抗剤、フルオロウラシル、テガフル、テガフル・ウラシル、カルモフル、ドキシフルリジン、ブロクスウリジン、シタラビン、エノシタビンなどのピリミジン代謝拮抗剤、メトトレキサート、トリメトトレキサートなどの葉酸代謝拮抗剤など、および、その塩もしくは複合体が挙げられる。

【 0 0 5 2 】

抗腫瘍性抗生物質としては、例えば、マイトマイシンC、ブレオマイシン、ペプロマイシン、ダウノルビシン、アクリルビシン、ドキソルビシン、ピラルビシン、T H P - アドリアマイシン、4' - エピドキソルビシン、エピルビシンなど

のアントラサイクリン系抗生物質抗腫瘍剤、クロモマイシンA₃、アクチノマイシンDなど、および、その塩もしくは複合体が挙げられる。

その他抗腫瘍剤としては、例えば、シスプラチン、カルボプラチン、タモキシフェン、カンプトテシン、イホスファミド、シクロホスファミド、メルファラン、L-アスパラギナーゼ、アセクラトン、シゾフィラン、ピシバニール、ウベニメクス、クレスチンなど、および、その塩もしくは複合体が挙げられる。また、プロカルバジン、ピボプロマン、ネオカルチノスタチン、ヒドロキシウレアなども挙げる事ができる。

抗腫瘍性植物成分としては、例えば、ビンデシン、ビンクリスチン、ビンブラスチンなどのビンカアルカロイド類、エトポシド、テニポシドなどのエピポドフィロトキシン類、および、その塩もしくは複合体が挙げられる。

BRMとしては、例えば、腫瘍壊死因子、インドメタシンなど、および、その塩もしくは複合体が挙げられる。

血管新生阻害剤としては、例えばフマジロール誘導体、および、その塩もしくは複合体が挙げられる。

細胞接着阻害剤としては、例えば、RGD配列を有する物質、および、その塩もしくは複合体が挙げられる。

マトリックス・メタロプロテアーゼ阻害剤としては、例えば、マリマスタット、バチマスタットなど、および、その塩もしくは複合体が挙げられる。

ホルモンとしては、例えばヒドロコルチゾン、デキサメタゾン、メチルプレドニゾン、プレドニゾン、プラスチック、ベタメタゾン、トリアムシノロン、オキシメトロン、ナンドロロン、メテノロン、ホスフェストロール、エチニルエストラジオール、クロルマジノン、メドロキシプロゲステロンなど、および、その塩もしくは複合体が挙げられる。

ビタミンとしては、例えば、ビタミンC、ビタミンA、および、その塩もしくは複合体が挙げられる。

【 0 0 5 3 】

本発明に係る患者に投与されたビフィドバクテリウム属菌は、抗生物質で簡単に殺すことができる。このことは、本発明に係る遺伝子輸送システムの安全性を

より高めるために重要である。

【 0 0 5 4 】

【実施例】

以下に実施例を示すが、本発明は下記の実施例にのみ限定されるものではない。また、実施例中、特に断らない限り、DNA等を取り扱う方法については、モレキュラー・クローニング第2版記載の方法を用いた。

実施例1 腫瘍組織におけるB. longumの集積と増殖の確認

(1) 担癌動物投与用B. longum溶液の調製

B. longum 105-AまたはB. longum 108-A [Biosci. Biotech. Biochem., 61, 1 211 (1997)] を含有する担癌動物投与用B. longum溶液は、以下のようにして調製した。なお、B. longum 105-Aは、FERM BP-7274を非選択条件下（スペクチノマイシン非存在下）にて下記のように培養したのち、75 μ g/ml スペクチノマイシンを加えた寒天含有改変Briggs broth（改変Briggs brothに寒天を1.5%になるように加えたもの）に塗布し、プラスミドが脱落したためスペクチノマイシン感受性を示す株として取得することができる。B. longum 105-AまたはB. longum 108-Aは、それぞれ改変Briggs培地 [A液 [0.5 g/l 可溶性でんぷん、6.0 g/l Bacto Yeast extract (Difco社製)、15.0 g/l ポリペプトン、2.0 g/l グルタミン酸ナトリウム、10.0 g/l 酢酸ナトリウム3水和物、4.0 g/l リン酸2水素カリウム、5.0 g/l 塩化ナトリウム、1.0 g/l tween80、400 ml/l トマトジュース抽出液（トマトジュース抽出液は、缶入りトマトジュース（デルモンテ社製） 400 mlに水 400 mlを加え、60℃で1時間保温後、100℃で5分間保持し、ハイフロースーパーセル（和光純薬株式会社製）を少量加え攪拌した後、アスピレーターで濾過することにより作成した）、水酸化ナトリウムでpH6.8に調整し、オートクレーブ滅菌したもの]、B液 [20% ラクトース水溶液をオートクレーブ滅菌したもの]、C液 [20.0 g/l L-システイン、340 g/l アスコルビン酸ナトリウムを濾過滅菌したもの] を、A液 100 : B液 10 : C液 1の比率で混合して作製] に植菌し、嫌氣的条件下、37℃にて静置培養で対数増殖中期まで増殖させた。

得られた培養液は、遠心分離にて菌体を沈殿させて上清を除いた後、PBS（リン酸緩衝化生理食塩水、8 g / 1 塩化ナトリウム、0. 2 g / 1 塩化カリウム、1. 44 g / 1 リン酸水素二ナトリウム、0. 24 g / 1 リン酸二水素カリウム、pH 7. 4）を加えて懸濁して、更に2度上記のように遠心分離操作を繰り返し、菌体を洗浄した。2度目の遠心分離後、上清を除いた菌体に、最初に遠心分離に供した培養液の10倍量または1 / 50量のPBSを加えて懸濁することにより、B. longum溶液を調製した。

【0055】

（2）担癌動物へのB. longumの投与

B. longum投与用の担癌動物には、6～8週令の雄C57BL/6マウス（日本 S L C 社から購入）にB16-F10 melanoma細胞またはLuwis lung cancer細胞を移植した2種類の担癌マウス、および6週令の雄Sprague-Dawleyラット（日本 S L C 社から購入）に7,12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA)を投与して作成された担癌ラットを用いた。

マウス接種用に用いた、B16-F10 melanoma細胞とLuwis lung cancer細胞は、それぞれ10%牛胎児血清を含有するDulbecco改変Eagle培地 [Virology, 8, 396 (1959)、Virology, 12, 185 (1960)] で、37℃、5%CO₂の条件下、一層培養にて調製した。培養したそれら癌細胞は、それぞれ 5×10^5 個をC57BL/6マウスの右大腿筋に接種し、接種後2週目に右外退部に固形癌を有する担癌マウスとしてB. longum投与試験に供した。

化学誘発乳癌ラットは、6週令の雄Sprague-Dawleyラットにゴマ油に溶解したDABA (10 mg / ml) 1 ml をゾンデを用いて胃内に投与し、一週間後もう一度等量のDMBAを投与することにより作製した。2回目の投与後、1ヶ月半～2ヶ月で腫瘍の大きさが直径5 mmに達したところで化学誘発乳癌ラットとしてB. longum投与試験に供した。

担癌動物へのB. longumの投与は、上記（1）で作成したB. longum菌体溶液を、マウスでは10倍希釈溶液を0. 5 ml (B. longum $5 \sim 6 \times 10^6$ 細胞分)、ラットでは1 / 50濃縮溶液を0. 5 ml (2×10^8 細胞分)、尾静脈より1回、全身投与する方法で行った。

【0056】

(3) B. longumの腫瘍組織への選択的集積および腫瘍組織での選択的増殖の観察

B. longumを投与した担癌マウスは6～8匹を、投与後1、24、48、72、96、168時間後に経時的に、担癌ラットは6匹を、投与後168時間後に、それぞれ犠牲死させて腫瘍組織および正常組織を摘出し、各組織抽出液を嫌氣的に培養することにより、腫瘍組織および正常組織内におけるB. longumの集積および増殖を解析した。

上記正常組織としては肺、肝臓、脾臓、腎臓および心臓を用い、マウス腫瘍組織としては右大腿部に形成された腫瘍組織を、ラット腫瘍組織としては乳癌組織を用いた。組織抽出液は、該組織を無菌環境下で該組織の重量を測定し、切断後、十分にすりつぶし、氷冷したPBSを該組織の10倍重量量加えてホモゲナイズして濾過することにより取得した。

各組織におけるB. longumの分布は、以下のようにして解析した。上記で調製した組織抽出液を希釈したもの(100 μ lあたり0.01gの組織を含有するように希釈したもの)を100 μ lずつ2枚のシャーレに分注し、あらかじめ55℃に保温し溶解しおいた、20mg/l L-システイン、340mg/l アスコルビン酸ナトリウムを含有するBriggs寒天培地(Briggs培地に1.5%寒天を加えた培地)を上記シャーレに注ぎ込み、よく攪拌した後、室温におくことで固化させた。該シャーレは、密封したデシケーター中で、嫌氣的条件下にて、37℃、3日間培養し、生育してきたB. longumのコロニーをカウントすることでB. longumの各組織内分布を解析した。

その結果、B. longum 105-Aまたは108-Aを全身投与したLewis lung cancer細胞接種担癌マウスとも、腫瘍組織1gあたり、60,000個のB. longumのコロニーが観察された。これに対し正常組織である肺、肝臓、脾臓、腎臓および心臓では96時間後には108-Aが、168時間後には105-Aが全く観察されなくなった(図7)。

B. longum105-Aまたは108-Aを投与したB16-F10 melanoma細胞を接種した担癌マウスにおいても、上記と同様な結果が得られた。

B. longum 105-Aを全身投与した化学誘発乳癌ラットでは、腫瘍組織 1 gあたり、10,000個のB. longumのコロニーが観察されたが、正常組織である肺、肝臓、脾臓、腎臓では168時間後にはまったく観察されなかった(図8)。

以上の結果から、B. longumは、腫瘍組織特異的に集積・増殖することが確認された。

【0057】

(4) ラクツロース (lacturose; 4-O- β -D-galactopyranosyl-D-fructofuranose) 投与によるB. longumの腫瘍組織内での増殖

ラクツロース (lacturose; 日研化学社より分譲) は、天然には存在していない合成糖であり、人、マウスおよび豚はlacturoseを代謝することができないことが知られている [Biochem. Biophys. Acta, 110, 635 (1965)、Pediatrics, 32, 1033 (1963)、Gastroenterology, 47, 26 (1964)、Die Nahrung, 11, 39 (1967)]。一方、B. longumは、lacturoseを炭素源として用いて生育可能である。

そこで、B. longum 105-Aを投与したLewis lung cancer細胞担癌マウス6～8匹に、B. longum投与後、連日8日間にわたり、20% ラクツロース (lacturose) 溶液を1ml腹腔内投与し、9日目に該マウスを犠牲死させて各組織内に存在するB. longumの菌数を解析したところ、ラクツロース (lacturose) 非投与群のコントロールに比べ、ラクツロース (lacturose) 投与担癌マウス群の腫瘍組織内に存在するB. longumの菌数は200倍になっていた。

以上の結果より、ラクツロース (lacturose) の投与により、腫瘍組織内のB. longumを選択的に増殖させることが可能であることが示された。

【0058】

実施例2 腫瘍組織におけるプラスミドDNAを有する組換えB. longumの特異的集積および増殖

(1) プラスミドDNAを有する組換えB. longumの作成

実施例1(1)に記載した方法により、嫌氣的条件下でB. longum 105-Aを培養した後、4℃に置いた。次に該培養液を遠心分離して菌体を沈殿させ、上清を除いた後、氷冷した10%グリセロール溶液を加えて懸濁した。上記操作を3回繰り返すことにより、B. longum菌体を十分に洗浄した。最後の洗浄の後、上清

を取り除き、最初の遠心分離に供した培養液量の1/10体積量の氷冷した10%グリセロール溶液を加えて懸濁し、エレクトロポレーションによる形質転換に供する菌体サンプルとした($2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$ コロニー形成単位(CFU)/50 μ l)。

形質転換に用いたプラスミドDNAであるpBLES100 [Biosci. Biotech. Biochem., 61, 1211 (1977)] は、Biosci. Biotech. Biochem., 61, 1211 (1997)に記載の方法により構築することもできるが、工業技術院生命工学技術研究所に寄託されているFERM BP-7274から常法によりプラスミドを抽出し、該DNAを制限酵素Hind III (宝酒造社製)で消化した後、フェノール処理・エタノール沈殿したDNAを水等に溶解し、T4 DNAリガーゼ (宝酒造社製)を用いて、該製品に添付されている使用説明書に従って、自己環化反応により結合させることによっても取得することができる。

B. longumの形質転換に用いたpBLES100は、以下のようにして調製した。上記のようにして取得したpBLES100を用いてEscherichia coli (E. coli) JM109の形質転換体を取得し、該形質転換体を75 μ g/ml スペクチノマイシン存在下で培養した。該培養によって得られる培養物から常法に従いプラスミドpBLES100を抽出し、塩化セシウム密度勾配超遠心 (モレキュラー・クローニング第2版)により精製することで、B. longumの形質転換用のpBLES100を得た。

上記で調製した50 μ l B. longum 105-A菌体サンプルと4 μ l pBLES100 (1 μ g DNA/4 μ l)を0.2 cm幅のエレクトロポレーション用のキュベット (Bio-Rad社製)に入れて混合し、5分間、氷上に置いた。該キュベットをGene Pulser (Bio-Rad社製)にセットして、2.0KV、25 μ F capacitor、200 Ω parallel resistanceの条件でエレクトロポレーションによる形質転換を行った。

電気パルスをかけた後、すばやく1 ml Briggs培地をキュベットに加え、該キュベットを37℃で3時間、静置した後、75 μ g/ml スペクチノマイシンを含有するBriggs寒天培地プレートに塗布した。該プレートは、Gas Pack Anaerobic Systems (BBL社製)を用いて嫌氣的条件下、37℃で3~4日間培養した。

出現してきたコロニーを数個ピックアップし、実施例 1 (1) に記載の方法にて培養し、QIAGEN Plasmid Mini Kit (キアゲン社製) を、菌体を溶解した P1 溶液にリゾチームを加えて 37℃ で 40 分間保温する以外は、該キットに添付の使用法に従って用いることにより該コロニーが保持するプラスミド DNA を抽出した。

抽出したプラスミド DNA は、数種類の制限酵素で消化した後、アガロースゲル電気泳動法により、その構造を確認し、該コロニーが pBLES100 を保持していることを確認した。

上記で得られた組換え体を B. longum 105-A/pBLES100 と命名した。

【 0 0 5 9 】

(2) 担癌動物への組換え B. longum 株の投与

担癌動物投与用の B. longum 105-A/pBLES100 溶液の調製は、改変 Briggs 培地に $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ のスペクチノマイシンを加えて培養する以外は、実施例 1 (1) と同様に調製した。

担癌マウスへの該溶液の投与は、担癌マウスに B16-F10 melanoma 細胞を移植した担癌マウスを用いて、また担癌ラットへの投与は、担癌ラットに化学誘発乳癌ラットを用いて、実施例 1 (2) と同様に行った。

(3) 組換え B. longum 株の腫瘍組織における選択的集積および増殖

B. longum 105-A/pBLES100 溶液を投与した担癌マウス 6～8 匹、および担癌ラット 6 匹を、4 日目に犠牲死させて、実施例 1 (3) に記載の方法に従い、腫瘍組織および各正常組織内における B. longum 105-A/pBLES100 の分布を解析した。ただし、組織抽出液と混合する培地には、 $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ スペクチノマイシンを加えた。

その結果、B16-F10 melanoma 細胞および Lewis lung cancer 細胞を接種した担癌マウスとも、非組換え B. longum 105-A を投与したコントロール群の腫瘍組織に分布する B. longum の細胞数と比較して、B. longum 105-A/pBLES100 を投与した担癌マウスの腫瘍組織に分布する B. longum 105-A/pBLES100 の細胞数は減少していなかった (図 9)。また、化学誘発乳癌ラットにおいても同様の結果が得られた (図 8)。

以上の結果より、腫瘍組織内において、B. longum 105-Aは、プラスミドpBLES 100を安定に保持できることがわかった。

次に、非組換えB. longum、およびB. longum 105-A/pBLES100を投与した担癌マウスに、それぞれ投与翌日から、連日スペクチノマイシン 2 0 0 m g / k g を腹腔内投与し、4日目に該マウスを犠牲死させて、B. longumの各組織内分布を解析した。

スペクチノマイシンの代わりに、連日PBSを腹腔内投与したコントロール群と比較して、非組換えB. longumを投与した担癌マウスでは、スペクチノマイシンの投与により、腫瘍組織に分布するB. longumの菌数が1%以下に低下していた。B. longum 105-A/pBLES100を投与した担癌マウスでは、スペクチノマイシンを投与しても、腫瘍組織に分布するB. longum 105-A/pBLES100の菌数は、コントロール群の81%を保っていた(図9)。

以上の結果から、腫瘍組織内特異的にスペクチノマイシン耐性遺伝子が発現していることが確認された。

【 0 0 6 0 】

実施例 3 シトシンデアミナーゼ (CD) を高発現する組換えB. longumを含有する抗腫瘍剤

(1) B. longum細胞内で高発現する遺伝子の取得

B. longum細胞内で高発現する遺伝子として知られているHU遺伝子〔HU蛋白質：ヒストン様DNA結合蛋白質、Biochimie, 72, 207 (1990)〕を、以下の方法により取得した。

B. longum ATCC15707株をBriggs培地を用いて、実施例 1 (1) に記載の方法に従い培養し、得られた菌体からモレキュラー・クローニング第2版に記載の方法に従い、染色体DNAを抽出・精製した。該染色体DNA 1 μ g を制限酵素Hind I IIで消化し、フェノール処理・エタノール沈殿により精製した。また、pBR322 (宝酒造社から購入) もHindIIIで消化し、脱リン酸処理後、同様に精製した。各々100 ngのDNAを、T4 DNAリガーゼ (宝酒造社製) を該製品に添付された使用説明書に従って用いることにより連結し、組換え体DNAを得た。

次に該組換えDNAを用いてE. coli mH3 [Gene, 45, 37 (1986)] を常法に従い

形質転換し、アンピシリン耐性で、かつテトラサイクリン感受性を示す形質転換体を取得した。

取得した約2000株の形質転換体から、常法に従いプラスミドDNAを抽出し、*E. coli* YK2741株 [Gene, 89, 133 (1990)] の形質転換に供した。YK2741株はHU遺伝子およびIHF (インテグレーション ホスト ファクター) 遺伝子が欠損しているため、低温感受性を呈する株である。従って、低温でも生育可能な形質転換体は、*B. longum*由来のHU遺伝子を保有する株の可能性がある。常法に従い形質転換を行い、アンピシリン含有寒天培地に塗布して27℃にて培養し、生育してきた形質転換体を後の実験に供した。

次に、上記で得られたYK2741株の形質転換体を培養し、上記の方法により各々の株が保持するプラスミドを抽出し、*E. coli* YK1340 [J. Mol. Biol., 204, 581 (1988)] の形質転換に供した。得られた形質転換体に対し、Muファージの感染試験をモレキュラー・クローニング第2版の方法に従い行った。YK1340株は、HU遺伝子の欠損株であり、Muファージはその増殖にHU蛋白質を必要とするため、Muファージが感染・増殖し、溶菌する形質転換体が*B. longum*由来のHU遺伝子を保有する株の有力な候補となる。

アンピシリン耐性を示し、かつMuファージが感染・増殖可し、溶菌する株が保有するプラスミドの1つをpBLHU15と命名し、その構造および性質を分析し、該プラスミドが*B. longum*由来のHU遺伝子を保有するプラスミドであることを確認した(図10)。

【0061】

(2) シトシンデアミナーゼ (CD) 高発現プラスミドの作製

CDをコードする遺伝子は、大腸菌由来のCDをコードする遺伝子を含有するプラスミドpAdex1CSCD (理化学研究所 ジーンバンク RDB No.1591) を鋳型として、配列番号2で表される塩基配列を有するDNAおよび配列番号3で表される塩基配列を有するDNAをプライマーセットとして用いて、PCRによって取得した。PCRは鋳型DNA 125 ng/l、プライマー各 0.5 μmol/l、Pfu DNAポリメラーゼ(ストラタジーン社製) 2.5 units、Pfu DNAポリメラーゼ用×10 緩衝液(ストラタジーン社製) 4 μl、deoxy NTP各 200 μ

m o l / l を含む反応液 4 0 μ l を用い、9 4 $^{\circ}$ C で 1 分、5 5 $^{\circ}$ C で 1 分、7 2 $^{\circ}$ C で 1 分の工程を 3 0 回繰り返したのち、7 2 $^{\circ}$ C で 1 5 分保温する条件で行った。

反応液の一部をアガロースゲル電気泳動して、約 1 . 3 k b の断片が増幅していることを確認し、残りの反応液をフェノール処理・エタノール沈殿して精製した後、TOP0 vector (フナコシ社製) に、上記キットを用いて連結した。連結して得られた組換え DNA を用いて、E. coli JM109 を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミド DNA を抽出して、目的とするプラスミド pTOP0-eCD が構築されていることを、各種制限酵素消化物をアガロースゲル電気泳動することにより確認した。pTOP0-eCD は、制限酵素 N s p V (宝酒造社製)、および H p a I (宝酒造社製) で消化した後、アガロースゲル電気泳動し、Gene clean kit (フナコシ社製) を該使用説明書に従って用い、約 1 . 3 k b の CD をコードする DNA 断片を精製した。

同様に実施例 3 (1) で得られたプラスミド pBLHU15 も N s p V および H p a I で消化し、6 . 7 k b の DNA 断片を精製した。

上記で得られた 1 . 3 k b および 6 . 7 k b の DNA 断片を上記のキットを用いて連結し、組換え体 DNA を取得し、該組換え体 DNA を用いて E. coli JM109 を常法に従い形質転換した。得られた形質転換体のうち、数株を培養して該培養物からプラスミドを抽出し、各種制限酵素で消化した DNA をアガロースゲル電気泳動法で解析することにより、HU 遺伝子のプロモーターの下流に CD 遺伝子を組込んだプラスミド DNA が取得できたことを確認した。

次に、該プラスミド DNA を H i n d III で消化して、アガロースゲル電気泳動することにより、HU 遺伝子および CD をコードする遺伝子を含有する、3 . 6 k b の DNA 断片を分離し、Gene clean kit を用いて精製した。また、前述した Escherichia-Bifidobacterium のシャトルベクターである pBLES100 も H i n d III で消化し、脱リン酸化処理をした。

上記 3 . 6 k b の DNA 断片と pBLES100 の H i n d III 消化物を、上記キットを用いて連結して組換え体 DNA を作製し、該組換え体 DNA を用いて E. coli JM109 を常法に従い形質転換した。

スペクチノマイシン耐性を示す形質転換体を数株ピックアップし、常法に従い該形質転換体が有するプラスミドDNAを抽出し、各種制限酵素で消化した後、アガロースゲル電気泳動により目的とするプラスミドが構築されていることを確認した。

以上のようにして作製された、HU遺伝子のプロモーターの下流にCDをコードする遺伝子を有する、Escherichia-BifidobacteriumのシャトルベクターをpBLES100-S-eCD（図11）と命名した。

また、上記で取得したpBLES100-S-eCDを保有するE. coli JM109からの、B. longum形質転換用プラスミドの調整は、実施例2（1）に記載の方法に従い、塩化セシウム密度勾配遠心法により行った。前記で調整されたpBLES100-S-eCDを用いて、実施例2（1）に記載の方法に従い、B. longum 105-Aを形質転換し、得られた形質転換株をB. longum 105-A/pBLES100-S-eCDと命名した。

B. longum 105-A/pBLES100-S-eCDは、ブタペスト条約に基づいて、平成12年8月15日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）に受託番号FERMBP-7274として寄託されている。

【0062】

実施例4 CDを高発現する組換えB. longumを含有する抗腫瘍剤

（1）担癌動物へのB. longum 105-A/pBLES100-S-eCDの投与

担癌動物への投与に用いるB. longum 105-A/pBLES100-S-eCD溶液は、実施例2（2）に記載の方法に従って調製した。

担癌マウスへの該溶液の投与は、担癌マウスにB16-F10melanoma細胞を右大腿筋に移植した担癌マウスを用いて、該大腿部の腫瘍に 1×10^7 個局注した。

（2）5-fluorocytosine (5-FC) から5-fluorouracil (5-FU) への腫瘍組織内特異的な変換

実施例4（1）で、B. longum 105-A/pBLES100-S-eCDを投与した担癌マウス6～8匹に、5-FC 500mg/kgを腹腔内へ連日投与し、併せて20% lacturose溶液 1mlをB. longum 105-A/pBLES100-S-eCD投与の翌日から連日腹腔内投与した。該投与は該担癌マウスを犠牲死させるまで行った。また、コントロ

ールにはB. longum 105-A/pBLES100-S-eCDを局注していない担癌マウスを用い、上記と同様に5-FCを連日投与した。

B. longum 105-A/pBLES100-S-eCD投与から8日目に該担癌マウスを犠牲死させ、大腿部腫瘍組織内の5-FU濃度を測定した。5-FU濃度の測定は、B. longum 105-A/pBLES100-S-eCDを局注した腫瘍組織、および局注していない腫瘍組織を摘出し、該腫瘍組織中の5-FU濃度測定〔GC-MS法、J. Chromatography, 564, 137 (1991)〕を大塚アッセイ研究所に依頼して行った。

その結果、B. longum 105-A/pBLES100-S-eCDを局注していない腫瘍組織内では10.0 ng/g程度の5-FUしか検出できなかったのに比べ、B. longum 105-A/pBLES100-S-eCDを局注した腫瘍組織内においては、588.8 ng/gの5-FUが検出された。

以上の結果から、全身投与された5-FCが腫瘍組織内特異的に5-FUに転換されることが確認された。

【0063】

【発明の効果】

本発明は、その一部がヒトの腸内常在菌であり、病原性がないビフィドバクテリウム属に属する嫌気性菌を遺伝子輸送担体として用いることにより、嫌気的環境下にある腫瘍組織において特異的に抗腫瘍活性を有する物質または転換酵素を発現させる方法、および該方法に用いる形質転換あるいは変異させたビフィドバクテリウム属に属する微生物を提供する。

該方法を主に固形腫瘍の治療に用いるにより、腫瘍の選択的治療が可能になり従来の腫瘍に対する化学療法剤による副作用が軽減されるという効果がある。また、今まで癌に有効でありながら副作用のために使用できなかった薬剤についても再び使用の可能性が出てくるという効果もある。

また、本発明は、ビフィドバクテリウム属に属する微生物に導入したDNAがコードするタンパク質を高発現させるための発現ベクターを提供することにある。これにより、嫌気的環境下にある腫瘍組織、主に固形腫瘍の治療を効率的に行うことができる。

【0064】

【配列表】

Sequence Listing

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Anaerobic bacterium as a drug for cancer gene therapy

<130> DK04J225

<140>

<141>

<160> 3

<210> 1

<211> 600

<212> DNA

<213> Bifidobacterium longum

<220>

<221> CDS

<222> (193)..(471)

<400> 1

```

gctgggcgcg gcggccatga agtggcttga caagcataat cttgtctgat tcgtctatatt 60
tcaatacctt cggggaaata gatgtgaaaa cccttataaa acgcggggttt tcgcagaaac 120
atgcgctagt atcattgatg acaacatgga ctaagcaaaa gtgcttgtcc cctgacccaa 180
gaaggatgct tt atg gca tac aac aag tct gac ctc gtt tcg aag atc gcc 231

      Met Ala Tyr Asn Lys Ser Asp Leu Val Ser Lys Ile Ala
            1              5              10
cag aag tcc aac ctg acc aag gct cag gcc gag gct gct gtt aac gcc 279
Gln Lys Ser Asn Leu Thr Lys Ala Gln Ala Glu Ala Ala Val Asn Ala
      15              20              25
ttc cag gat gtg ttc gtc gag gct atg aag tcc ggc gaa ggc ctg aag 327
Phe Gln Asp Val Phe Val Glu Ala Met Lys Ser Gly Glu Gly Leu Lys
      30              35              40              45
ctc acc ggc ctg ttc tcc gct gag cgc gtc aag cgc ccg gct cgc acc 375

```

Leu Thr Gly Lue Phe Ser Ala Glu Arg Val Lys Arg Pro Ala Arg Thr	
50 55 60	
ggc cgc aac ccg cgc act ggc gag cag att gac att ccg gct tcc tac	423
Gly Arg Asn Pro Arg Thr Gly Glu Gln Ile Asp Ile Pro Ala Ser Tyr	
65 70 75	
ggc gtt cgt atc tcc gct ggc tcc ctg ctg aag aag gcc gtc acc gag	471
Gly Val Arg Ile Ser Ala Gly Ser Leu Leu Lys Lys Ala Val Thr Glu	
80 85 90	
tgaccttctg ctcgtagcga ttacttcgag cattactgac gacaaagacc ccgaccgaga	531
tggtcgggggt ctttttgttg tgggtgctgtg acgtgttgtc caaccgtatt attccggact	591
agttcagcg	600
<210> 2	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA	
<400> 2	
ggttcgaata acgcttta	18
<210> 3	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA	
<400> 3	
cggttaactc aacgtttgta atc	23

【 0 0 6 5 】

【図面の簡単な説明】

【図1】 pBLE5100のプラスミド模式図を示す。1本線で表されている部分は、大腸菌 (*Escherichia coli*) ベクター pBR322を表し、太く塗りつぶした線で表されている部分は B. longum 菌由来の pTB6 プラスミド (3.6 kb) を表し、中抜きの線で表されている部分はエンテロコカス ファエカリス (*Enterococcus Faecalis*) 由来の 1.1 kb の HindIII・EcoRI 断片を表す。また、 Spec^r はスペクチノマイシン耐性遺伝子を表し、Ori は複製原点を表す。

【図2】 pBL595のプラスミド模式図を示す。

【図3】 pBLEM100のプラスミド模式図を示す。なお、太く塗りつぶした部分は B. longum 菌 SBT595 株由来プラスミド pBL595 を表し、太い中抜きの部分は B. longum 菌由来の pBR329 の AvaI・HindIII 断片を表し、細い線の部分はエンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) 由来 pAM β 1 の HindIII・AvaI 断片を表す。

【図4】 pBL67のプラスミド模式図を示す。

【図5】 pBL78のプラスミド模式図を示す。

【図6】 HU 遺伝子とシトシンデアミナーゼを組み込んだ pBLE5100 のプラスミド模式図を示す。なお、一本線で表されている部分は、大腸菌 (*Escherichia coli*) ベクター pBR322 を表し、太く塗りつぶした線で表されている部分は B. longum 菌由来の pTB6 プラスミド (3.6 kb) を表し、中抜きの線で表されている部分はエンテロコカス ファエカリス (*Enterococcus Faecalis*) 由来の 1.1 kb の HindIII・EcoRI 断片を表し、散点模様の部分は B. longum 菌遺伝子の HindIII 処理断片を表し、中に矢印が描かれた中抜きの線で表されている部分は大腸菌由来の CD 遺伝子を表し、その前 (Ori に近いほう) の網掛けの部分は、HU 遺伝子のプロモーターを含む領域を、その後ろの斜線部分はターミネーターを含む領域を表す。また、 Spec^r はスペクチノマイシン耐性遺伝子を表し、Ori は複製原点を表す。

【図7】 担癌マウスに B. longum 菌を静注投与した後の、各種臓器組織および腫瘍組織に存在する該微生物のコロニー数を経時的に示した図である。○は B. longum105-A、□は B. longum108-A 投与時の結果を示す。

す。

【図 8】 担癌ラットに B. longum105-A (網掛けで示す) または pBLE S100 で形質転換された B. longum105-A (白抜きで示す) を静注投与し、168 時間後に各種臓器組織および腫瘍組織に存在する該微生物のコロニー数を示した図である。

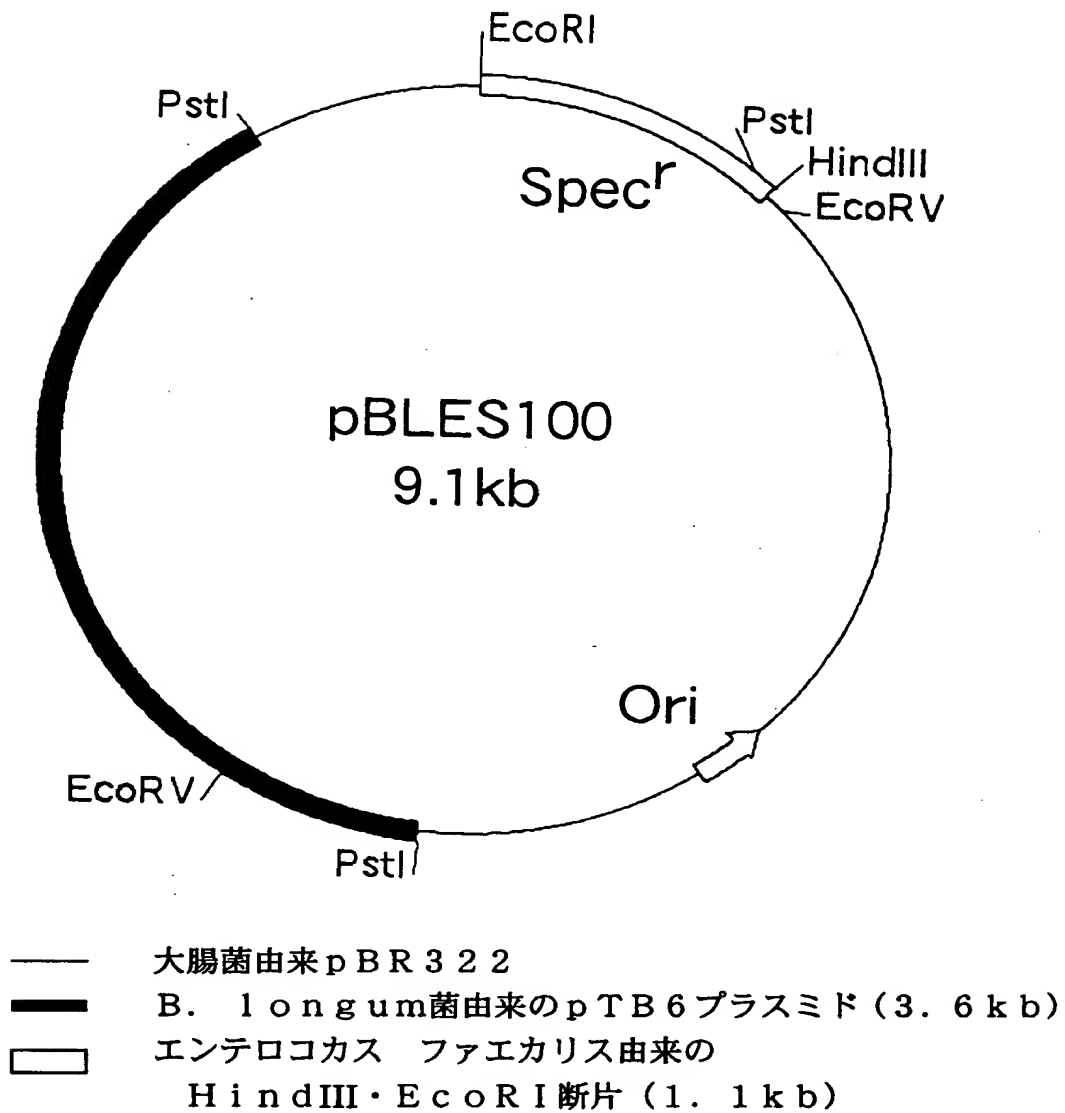
【図 9】 担癌マウスに B. longum105-A、または B. longum105-A/pBLES100 を静注投与し、かつスペクチノマイシンを投与したときの、腫瘍細胞に存在する各々の微生物のコロニー数を示す図である。白抜きは B. longum105-A、網掛けは B. longum105-A/pBLES100 を投与群を表し、コントロールはスペクチノマイシン非投与、スペクチノマイシンはスペクチノマイシン投与群を表す。

【図 10】 B. longum 由来の HU 蛋白質をコードする DNA を含有するプラスミド pBLHU15 の模式図を示す。なお、散点模様の部分は B. longum 菌遺伝子の Hind III 処理断片を表し、一本線および中抜きの線で表されている部分は、pBR322 プラスミドを表し、太く塗りつぶした線で表されている部分は、B. longum 由来の HU 遺伝子を表す。また、 Amp^R はアンピシリン耐性遺伝子を、 Tet^R はテトラサイクリン耐性遺伝子を表し、Ori は複製原点を表す。

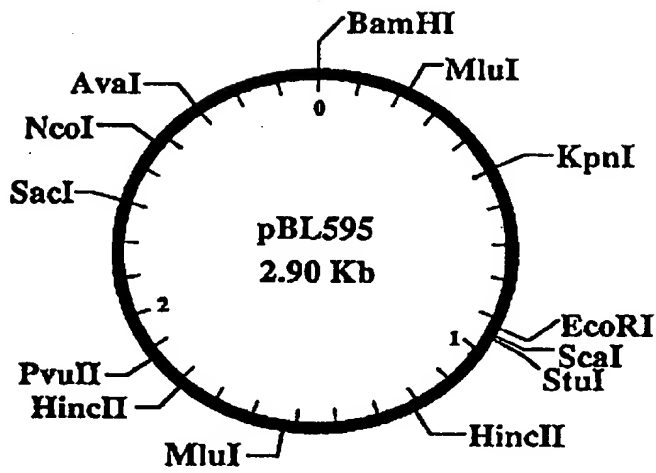
【図 11】 大腸菌由来の CD を組込んだ B. longum 用の発現プラスミドベクター pBLES100-S-eCD の構築過程を示す図である。

【書類名】 図 面

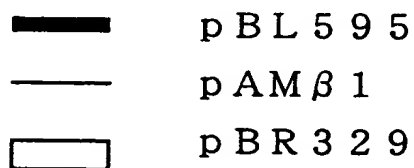
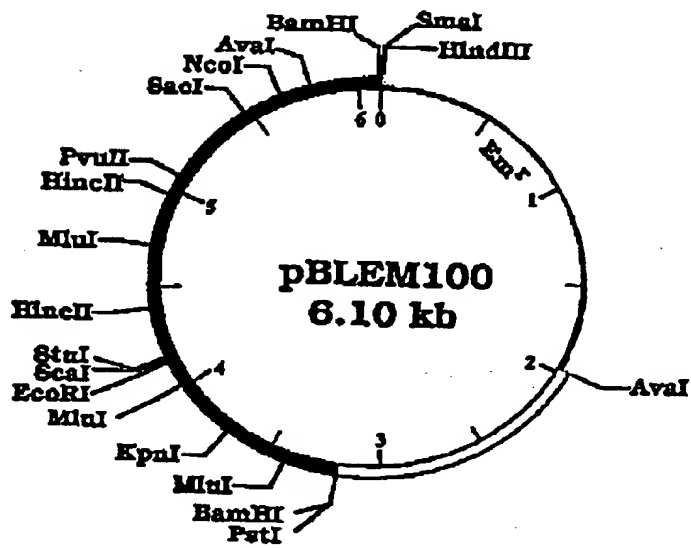
【図 1】



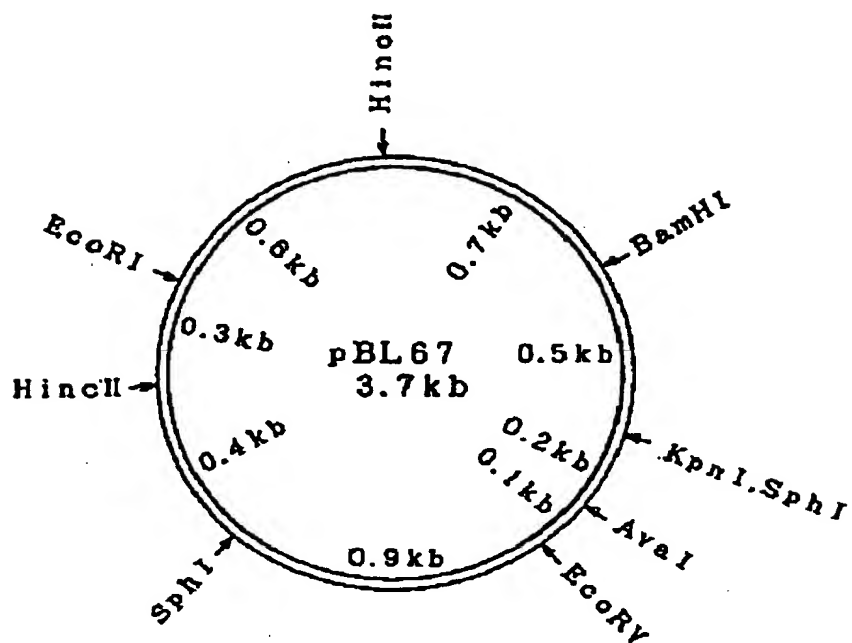
【図 2】



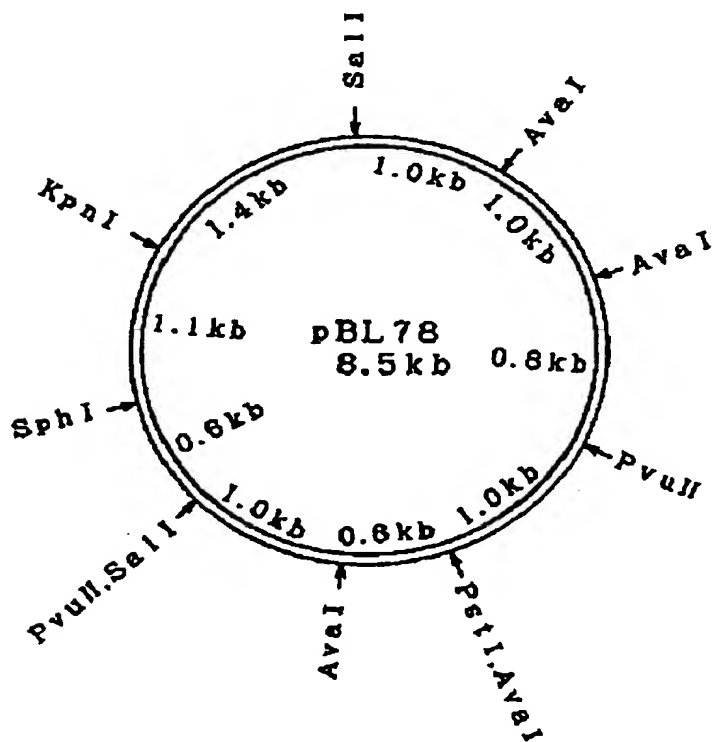
【図 3】



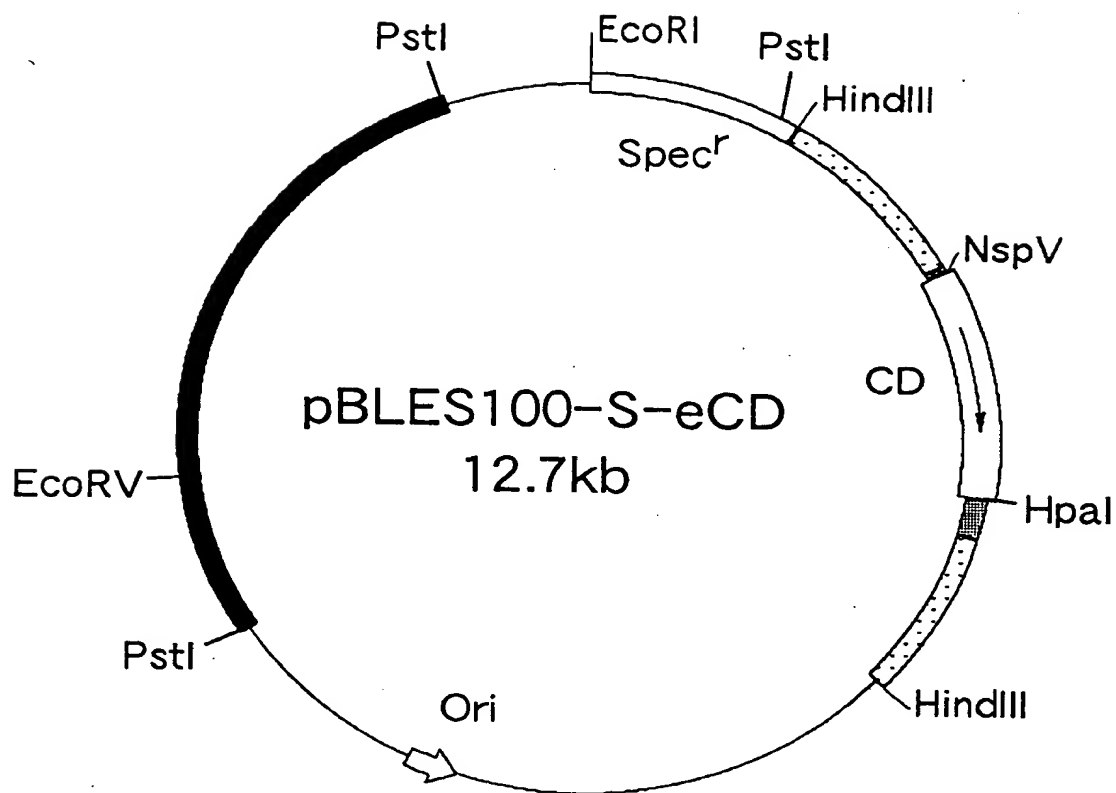
【図4】



【図5】

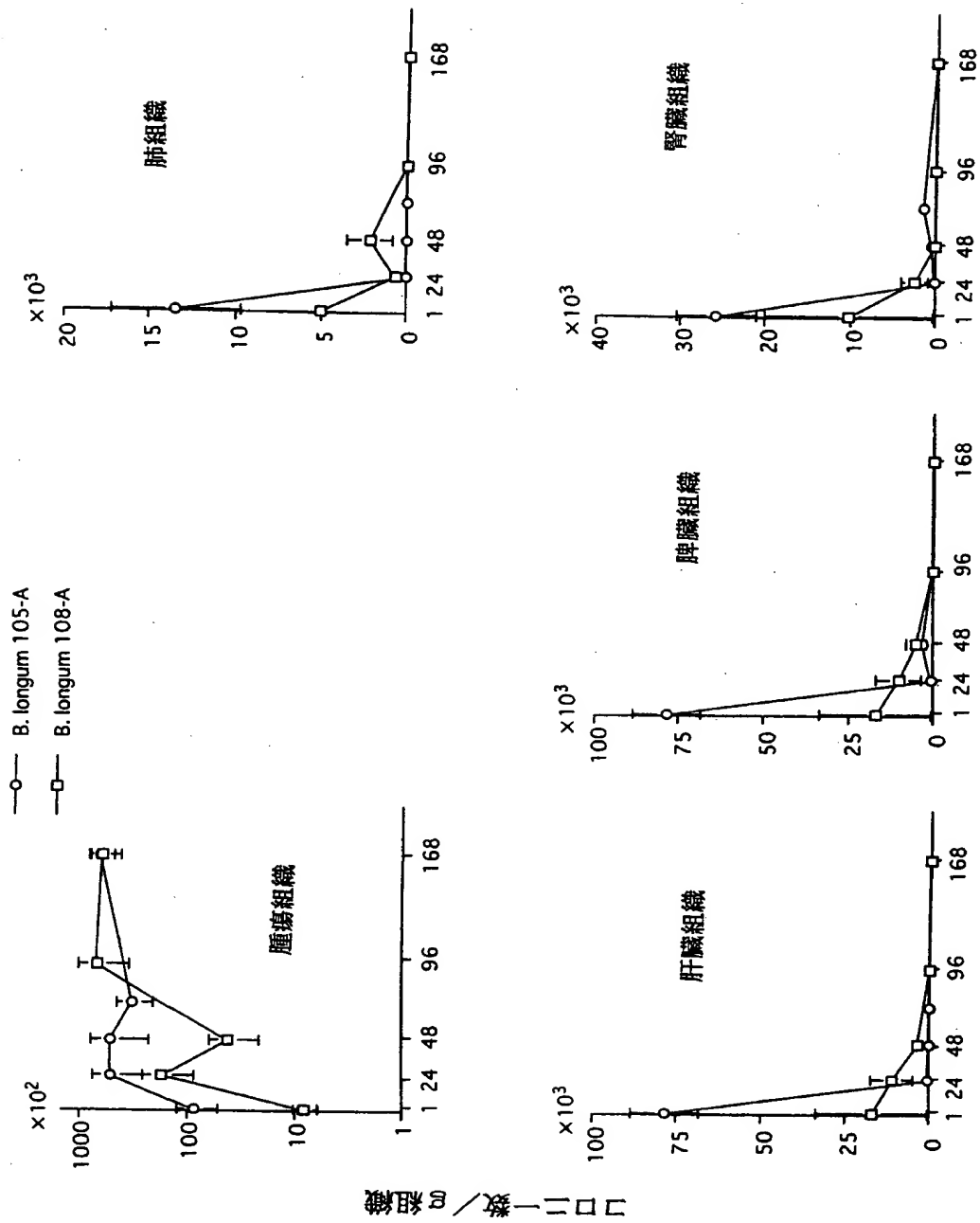


【図6】



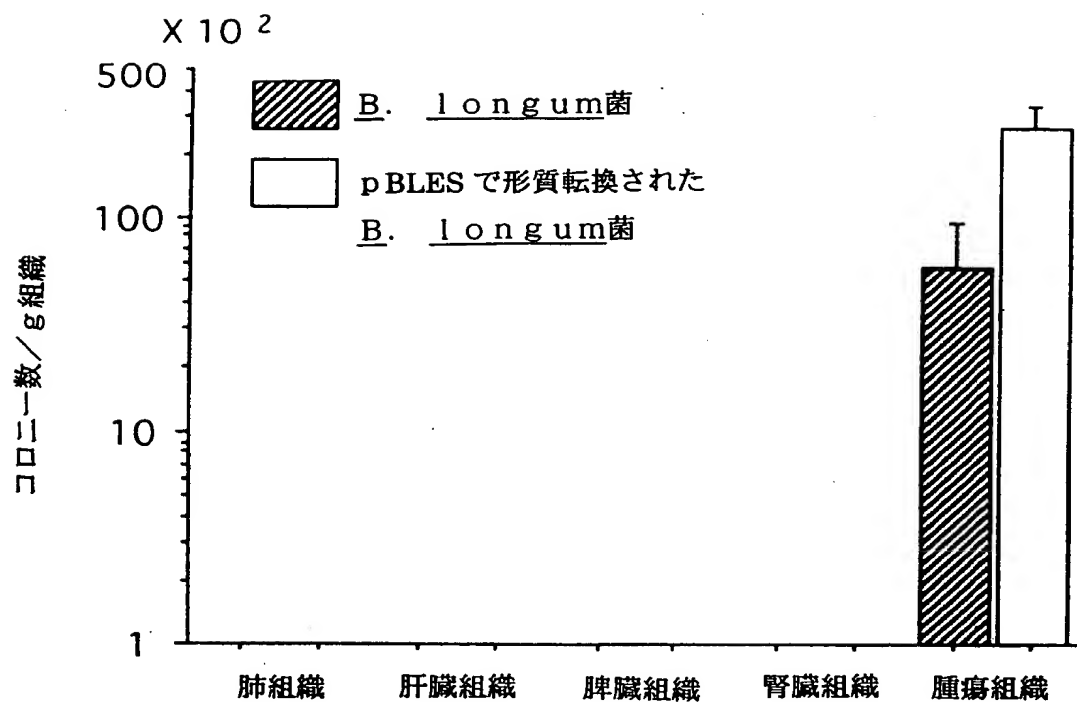
- 大腸菌由来 pBR322
- *B. longum* 菌由来の pTB6 プラスミド (3.6 kb)
- エンテロコカス ファエカリス由来の HindIII・EcoRI 断片
- 大腸菌由来の CD 遺伝子
- B. longum 菌遺伝子の HindIII 処理断片
- B. longum 菌由来の HU 遺伝子のプロモーターを含む領域
- B. longum 菌由来の HU 遺伝子のターミネーターを含む領域

【図7】

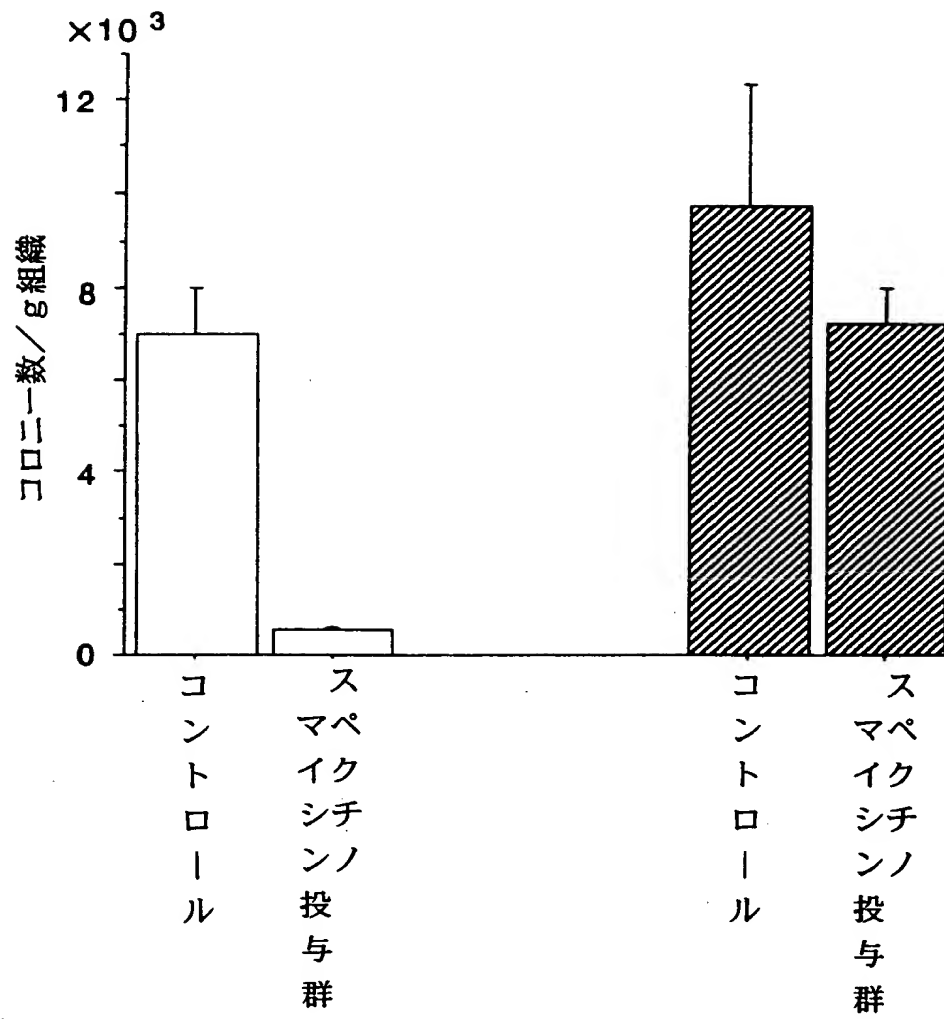


B. longum菌投与後の時間

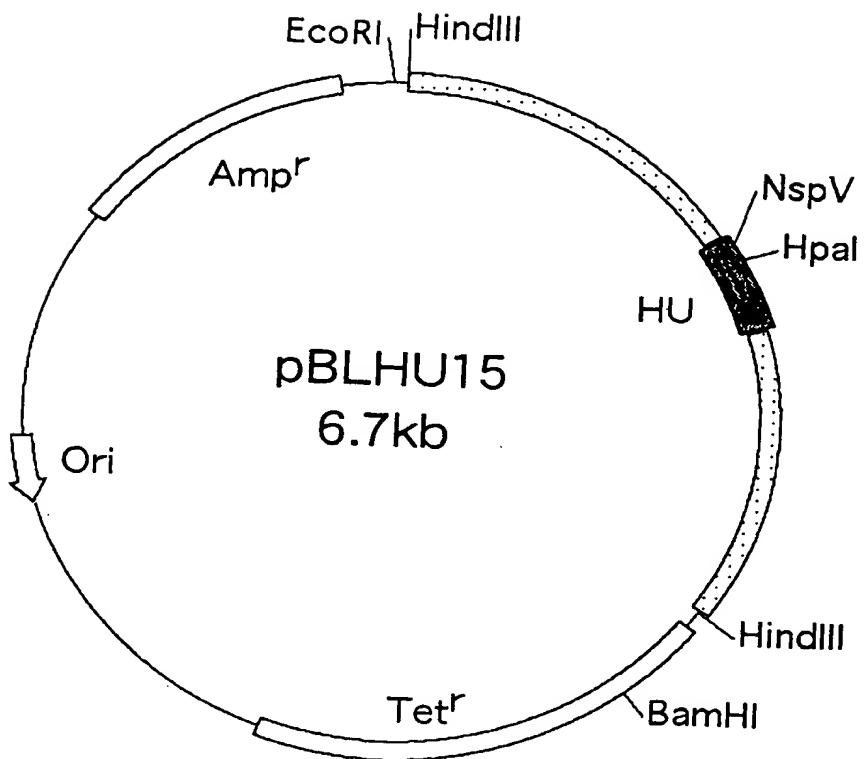
【図 8】



【図9】

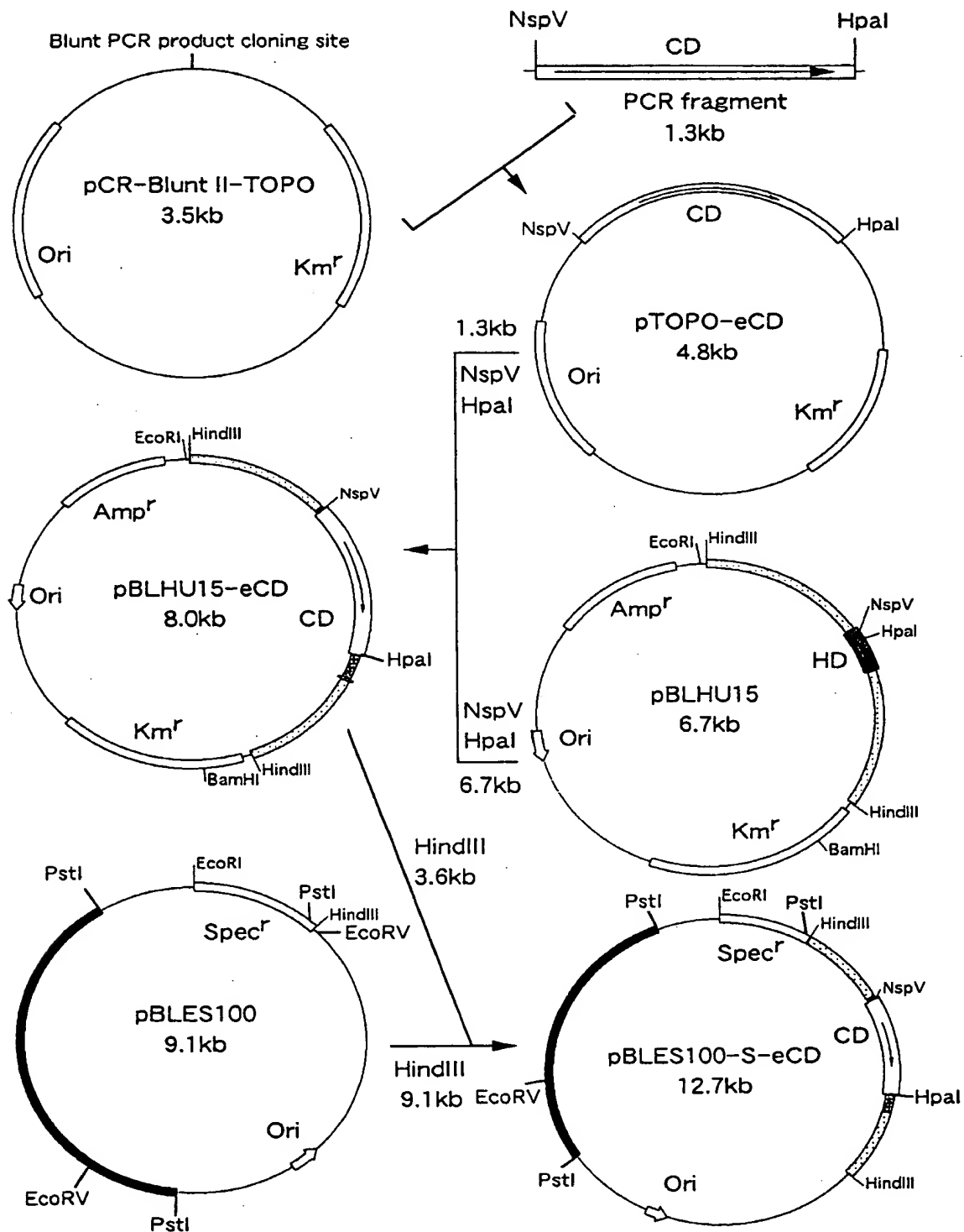


【図 10】



- 大腸菌由来 pBR322
- B. longum 菌の HU 遺伝子
- 大腸菌由来 pBR322 のアンピシリン耐性遺伝子
Amp^r
- 大腸菌由来 pBR322 のテトラサイクリン耐性遺伝子
Tet^r
- ⋯ B. longum 菌遺伝子の HindIII 処理断片

【図 11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課 題】 本発明の目的は、固形腫瘍の遺伝子治療に有効で、かつ人畜により安全な遺伝子輸送担体としてのビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する嫌気性菌、および上記嫌気性菌を含有することを特徴とする医薬を提供することにある。

【解決手段】 抗腫瘍活性を有するタンパク質をコードするDNAまたは抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有するタンパク質コードするDNAを、嫌気的環境下にある腫瘍組織特異的に輸送し、該DNAにコードされる蛋白質を発現することができるビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する微生物およびそれを含有する医薬。

【選択図】 図6

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名 協和醗酵工業株式会社